

**UNIVERSITÉ DU QUÉBEC**

**MÉMOIRE PRÉSENTÉ À  
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT**

**PAR  
CHAÂBANE IBN CHAABANE**

**DISCRIMINATION ENTRE LE MAÏS ET LES MAUVAISES HERBES  
PAR L'ANALYSE DE LEUR SIGNATURE SPECTRALE DE FLUORESCENCE  
MESURÉE SOUS DIFFÉRENTES INTENSITÉS LUMINEUSES**

**MARS 2010**

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

## **REMERCIEMENTS**

Un remerciement particulier à Marlène Piché et Gilles St-Laurent pour leur aide professionnelle et technique dans la prise de données, la culture et l'entretien des plantes pour l'expérimentation. Je remercie infiniment Guy Samson et Bernard Panneton pour leur travail impressionnant pour la réalisation de ce projet de recherche ainsi pour leur soutien financier.

.

## RÉSUMÉ

La classe des pesticides la plus importante est de loin celle des herbicides. Leur élimination dans l'agriculture causerait des pertes de culture qui résulteraient en de graves problèmes économiques et humains. Tout programme de réduction de l'utilisation des herbicides doit donc assurer la protection de l'environnement agricole tout en maintenant la productivité des cultures, deux priorités de notre société.

Une des stratégies prometteuses menant à la réduction des herbicides repose sur l'observation selon laquelle les mauvaises herbes ne sont pas distribuées uniformément au champ, mais se retrouvent souvent de façon agglomérée. Par conséquent, une réduction de l'utilisation des herbicides est possible par leur application seulement qu'aux endroits infestés par les mauvaises herbes plutôt qu'une application uniforme dans les champs.

Les opérations pour localiser et traiter des îlots de mauvaises herbes dans les champs peuvent s'effectuer par diverses techniques faisant partie de l'agriculture de précision. L'une de ces opérations est l'identification automatique des mauvaises herbes à partir de leurs signatures spectrales de fluorescence. Cette approche fait l'objet de notre travail.

L'excitation d'une feuille par des radiations UV induit l'émission de deux types distincts de fluorescence, une fluorescence bleu-vert (FBV) et la fluorescence chlorophyllienne (FChl) avec ses pics caractéristiques dans le rouge (FR) et le rouge lointain (FRL). Cette signature spectrale varie selon l'espèce, les conditions environnementales dans lesquelles les plantes ont été cultivées et les conditions (surtout l'intensité lumineuse ambiante) lors des mesures de fluorescence.

Une étude récente menée lors d'un projet de maîtrise par Louis Longchamps à l'Université Laval a démontré le fort potentiel de l'analyse spectrale de la fluorescence des végétaux à discriminer efficacement entre quatre hybrides de maïs et huit espèces de mauvaises herbes représentatives du sud du Québec cultivées sous des conditions

contrôlées dans des chambres de croissance. Puisque l'émission de fluorescence varie selon les conditions de croissance et les conditions ambiantes lors des mesures, il est important de vérifier si les résultats de l'étude de Longchamps peuvent être reproduits sous des conditions se rapprochant de celles des champs, c'est-à-dire avec des plantes cultivées à l'extérieur et soumises à différentes intensités lumineuses lors des mesures de fluorescence. Pour répondre à cette question, nous avons donc refait le travail avec les mêmes espèces mais cultivées à l'extérieur, dont les spectres de fluorescence ont été mesurés à différentes intensités lumineuses.

L'hypothèse de recherche est qu'il est possible de classer les plantes sur la base de leurs spectres de fluorescence induite par UV selon trois groupes : maïs, mauvaises herbes monocotylédones et mauvaises herbes dicotylédones. Deux autres hypothèses complémentaires ont été posées : l'intensité lumineuse ambiante affecte la signature spectrale de fluorescence et le potentiel discriminant de la fluorescence.

Dans un premier temps, nous avons étudié et quantifié les impacts des variations de l'intensité lumineuse ambiante (allant de l'obscurité jusqu'à  $900 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) sur les spectres de fluorescence. Les caractéristiques spectrales ont été quantifiées par deux types de ratios, soit les ratios FBV/FR et FR/FRL, que nous avons reliés aux changements des paramètres de fluorescence chlorophyllienne ( $F_s$ , QN et QP) mesurés selon la méthode des flashes saturants. Lors de cette première partie de travail, nous avons utilisé seulement trois espèces dont chacune représente un groupe des plantes : le maïs *Monsanto DKC 26-78* (M), la mauvaise herbe monocotylédone *Echinochloa crus-galli* (L.) et la mauvaise herbe dicotylédone *Chenopodium album* (L.). Sous nos conditions expérimentales, les variations de l'intensité lumineuse modifiaient significativement les spectres d'émission de la fluorescence des végétaux, diminuant le ratio FBV/FR mais non pas le ratio FR/FRL.

L'efficacité de la signature spectrale de fluorescence à discriminer les groupes des plantes (maïs et mauvaises herbes monocotylédones et dicotylédones) cultivées à l'extérieur a été étudiée à l'aide d'une méthode SIMCA de classification des données. Le matériel végétal utilisé comprend 7 espèces de mauvaises herbes annuelles et

4 hybrides de maïs. Ces onze plantes/hybrides appartiennent à trois groupes: quatre hybrides de *Zea Maïs* (L) (Elite 60T05, Monsanto DKC 26-78, Pioneer 39Y85 (RR), Syngenta N2555 (BT, LL)), quatre espèces de mauvaises herbes annuelles monocotylédones (*Digitaria ischaemum* (Schreb), *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv., *Panicum capillare* (L.), *Setaria glauca* (L.) Beauv.) et trois espèces de mauvaises herbes dicotylédones (*Amaranthus retroflexus* (L.), *Chenopodium album* (L.), *Capsella bursa-pastoris* (L.) Med.). Pour chacune des plantes, 12 lectures ont été prises, une à chaque intensité lumineuse pour trois campagnes de mesure. Un jeu de données de 528 lectures a été constitué. En analysant les signatures spectrales induites par UV avec l'analyse SIMCA, on a obtenu un taux de succès de classification de 99 % à l'obscurité. La majeure partie d'erreur provient de la confusion entre le maïs et les mauvaises herbes monocotylédones. La deuxième source d'erreur provient de la confusion entre les mauvaises herbes monocotylédones et dicotylédones. Une observation plus approfondie des résultats permet de voir que la mauvaise herbe dicotylédone « *Amaranthus retroflexus* » génère le majeur pourcentage d'erreur entre les mauvaises herbes monocotylédones et dicotylédones. Les résultats obtenus montrent qu'il est possible de discriminer entre les maïs et les mauvaises herbes (mono et dico) avec un pourcentage de réussite important avec un taux de succès de 99 % à l'obscurité. Malgré les variations causées sur la signature spectrale de fluorescence, l'intensité lumineuse ambiante affecte peu le potentiel discriminant de la fluorescence induite par UV. Ainsi, le taux de succès varie entre 99 % à l'obscurité et 95 % sous  $900 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Ceci nous a permis d'étalonner des modèles performants et robustes permettant d'obtenir un bon pourcentage de bien classé à toutes les intensités (entre 86 % et 97 %).

Dans une autre étape, nos données ont été comparées à celles de Longchamps *et al* (2006). Ces dernières ont été cultivées en conditions contrôlées en cabinet de croissance. Nos données ont été obtenues à partir des plantes qui ont poussé à l'extérieur. Il a donc été intéressant de comparer les résultats obtenus avec ces 2 jeux de données pour voir si les conditions de croissance ont un impact sur le potentiel discriminant. Comparés à ceux de Longchamps *et al*. (2006), les spectres de nos plantes ont une FBV plus élevée et une FChl relativement moins importante. L'erreur de prédiction chez les plantes cultivées sous conditions contrôlées est plus élevée (10 %)

que chez les plantes cultivées à l'extérieur (7 %). La source d'erreur la plus importante est la même chez les deux types des plantes. Il s'agit de la confusion entre le maïs et les mauvaises herbes monocotylédones. La différence dans l'erreur de prédiction est due aux conditions variables de mesure des spectres de fluorescence dans les travaux de Longchamps (2006). Cette variabilité environnementale a inévitablement induit une variabilité additionnelle dans les spectres de fluorescence.

## TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS .....	ii
RÉSUMÉ.....	iii
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES FIGURES .....	xi
LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS.....	xiv
CHAPITRE I <b>INTRODUCTION</b> .....	1
1.1     Introduction : contexte et problématique générale .....	1
1.1.1     Vers une réduction de l'utilisation des herbicides dans les champs.....	1
1.1.2     Identification des mauvaises herbes .....	2
1.1.3     Aperçu du projet de recherche.....	5
1.2     Les objectifs du projet .....	6
CHAPITRE 2 <b>REVUE DE LITTÉRATURE</b> .....	8
2.1     La fluorescence : principes physiques et généralités .....	8
2.2     La fluorescence bleu-vert (FBV) (400-630 nm) .....	10
2.3     La fluorescence chlorophyllienne (FChl) (650-800 nm).....	11
2.3.1     Cinétique d'induction de la FChl (Courbe de Kautsky).....	12
2.3.2     Atténuation de la fluorescence chlorophyllienne .....	14
2.3.2.1     Atténuation (quenching) photochimique (QP) de la FChl .....	14
2.3.2.2     Atténuation (quenching) non-photochimique (QN) de la FChl .....	15
2.4     Les facteurs qui affectent la signature spectrale de la fluorescence.....	16
2.4.1     Les propriétés intrinsèques de la feuille .....	17
2.4.2     Longueur d'onde d'excitation .....	19



2.4.3	Les facteurs environnementaux.....	21
2.4.3.1	L'intensité lumineuse ambiante .....	21
2.4.3.2	Carences minérales .....	22
2.4.3.3	Le stress hydrique .....	22
2.4.3.4	La température .....	23
2.4.3.5	Attaque par les insectes.....	23
2.4.3.6	Traitement par un herbicide .....	24
<b>CHAPITRE 3</b>	<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES.....</b>	<b>25</b>
3.1	Matériel végétal.....	25
3.2	Mesure des coefficients de quenching .....	26
3.3	Mesure des spectres de fluorescence.....	28
3.4	Acquisition et traitement des données.....	31
3.5	La méthode de classification SIMCA .....	32
<b>CHAPITRE 4</b>	<b>RÉSULTATS ET DISCUSSIONS .....</b>	<b>34</b>
4.1	Variations causées par l'intensité lumineuse sur les spectres de la fluorescence émises par des plantes cultivées sous conditions naturelles au champ .....	34
4.1.1	Variation des paramètres de la fluorescence chlorophyllienne, $F'_0$ , $F'_M$ et $F_s$ en fonction de l'intensité lumineuse .....	34
4.1.2	Variations de quenching photochimique (QP) et non photochimique (QN) en fonction de l'intensité lumineuse .....	36
4.1.3	Effet de l'intensité lumineuse sur la forme des spectres de fluorescence.....	38
4.1.3.1	Effet de l'intensité lumineuse sur le ratio FBV /RF.....	38
4.1.3.2	Effet de l'intensité lumineuse sur le ratio FR/FRL.....	39
4.1.4	Discussion .....	39

4.1.5	Conclusion.....	43
4.2	Discrimination entre le maïs et les mauvaises herbes.....	43
4.2.1	Tri des données à visuelle et basé sur l'analyse en composantes principales .....	43
4.2.2	Classification à partir des données acquises à $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .....	48
4.2.3	Effet de l'intensité lumineuse sur la classification .....	61
4.2.4	Comparaison des résultats de classification – plantes cultivées à l'extérieur et mesures de fluorescence sous lampe versus plantes cultivées en cabinet de croissance et mesures en serre .....	69
4.2.5	Conclusion.....	72
<b>CHAPITRE 5</b>	<b>CONCLUSION GÉNÉRALE .....</b>	<b>74</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>		<b>79</b>

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
3.1 Matériel végétal utilisé pour l'expérimentation.....	26
4.1 Nombre d'échantillons par espèce et par intensité lumineuse après tri des spectres .....	48
4.2 Nombre de composantes principales pour les différents sous-modèles lors de classification par espèce/hybride .....	53
4.3 Matrice de confusion des plantes classées par espèce/hybride. Les sous-matrices de confusion intraclasses sont en couleur. Rouge : maïs (E, M, P et S); vert : mauvaises herbes monocotylédones (DI, EC, PC et SG); bleu : mauvaises herbes dicotylédones (AR, CA et CB).....	54
4.4 Matrice de confusion obtenue par le modèle SIMCA où on utilise la totalité de spectre. Erreur de prédiction : 5 %.....	61
4.5 Nombre de composantes principales retenues pour le modèle SIMCA construit à différentes intensités lumineuses. Trois classes : maïs, mauvaises herbes monocotylédones et mauvaises herbes dicotylédones (e.g. 2-3-2 : 2 CPs pour le maïs, 3 pour les monocotylédones et 2 pour les dicotylédones).....	62
4.6 Pourcentage de bien classés en validation croisée (diagonale) et en prédiction (hors diagonale). Dans le tableau, la valeur de 96 % à la ligne I1 et à la colonne I2 signifie que 96 % des échantillons mesurés sous une intensité I2 ont été bien classés par un modèle SIMCA étalonné avec des données obtenues sur I1 .....	63
4.7 Pourcentage de bien classés en validation croisée (diagonale) et en prédiction (hors diagonale). Filtre sur 95 nm.....	65
4.8 Matrice de confusion obtenue par le modèle SIMCA avec les plantes cultivées en conditions contrôlées. Pourcentage par classe entre parenthèse .....	71
4.9 Matrice de confusion obtenue par le modèle SIMCA avec les plantes cultivées à l'extérieur .....	72

## LISTE DES FIGURES

Figure	Page
2.1 Spectres d'émission de fluorescence induite par excitation UV et détectée à partir d'une feuille typique (Buschmann <i>et al.</i> 2000).....	9
2.2 Portion d'une coupe transversale d'une feuille de dicotylédone excitée par UV montrant l'origine de deux types de fluorescence. La FChl provient principalement des cellules de mésophylle tandis que la FBV détectée est émise principalement par les cellules de l'épiderme et des vaisseaux vasculaires .....	11
2.3 Aperçu de la courbe de Kautsky. Le rendement de la fluorescence chlorophyllienne est maximal ( $F_M$ ) lorsque tous les accepteurs d'électrons sont réduits et il est minimal ( $F_0$ ) lorsqu'ils sont oxydés. Le rendement de la fluorescence est aussi influencé par l'atténuation non-photochimique. Les points (O, I, D, P et T) sont des abréviations conventionnelles attribuées aux différents points de la courbe de Kautsky (Tyystjarvi <i>et al.</i> , 1999).....	13
2.4 Courbe de fluorescence chlorophyllienne induite par une lumière actinique et des flashes saturants, montrant les différents types de quenching de la fluorescence chlorophyllienne d'une feuille d' <i>Arabidopsis</i> . $F_0$ niveau minimal de la fluorescence, $F_m$ niveau maximal de la fluorescence, $F_m'$ niveau de la fluorescence suite à un flash saturant après un éclairage, QP quenching photochimique, (qI, qT et qE) forme le quenching non-photochimique. Le retour à $F_m'$ après quelques minutes suite à l'arrêt de l'éclairage témoigne du relâchement du qE (Müller 2001). .....	16
2.5 Effet de la réabsorption de la fluorescence réellement émise sur le spectre mesuré de la fluorescence chlorophyllienne. A. Spectre d'absorption de la feuille et spectre de la fluorescence réellement émise. B. Comparaison de la fluorescence mesurée et celle réellement émise (Buschmann <i>et al.</i> , 1998).....	18
2.6 Relation curvilinéaire inverse entre le ratio $F_{685}/F_{735}$ ( $\square$ ) et la concentration en chlorophylles dans des feuilles de hêtre et de bouleau (Adapté de Gitelson <i>et al.</i> , 1998).....	19
2.7 Spectre de la fluorescence émise sous deux longueurs d'ondes d'excitation par la face adaxiale d'une feuille de maïs cultivé à l'extérieur (355 et 532 nm) (Crop <i>et al.</i> , 2003).....	20

3.1	Cinétique de fluorescence pour une feuille adaptée à l'obscurité et une autre adaptée à la lumière. mod = lumière modulée, sat = lumière saturante, -act = lumière actinique éteint, $F_0$ = niveau minimal de la fluorescence (constante), $F_M$ = niveau maximal de la fluorescence, $F_v$ = fluorescence variable, $F'_M$ = fluorescence maximale à l'éclairage (fluorescence maximale moins la lumière utilisée par autres voies de dissipation d'énergie), $F'_0$ = niveau minimal de la fluorescence induit sous lumière rouge lointain pour ré-oxyder tous les $Q_A^-$ en $Q_A$ (Lambers <i>et al.</i> , 1998).....	27
3.2	Photo du spectrofluoromètre utilisé pour la mesure des spectres de fluorescence (gauche) ainsi du fluorimètre modulé Xénon-PAM pour la mesure des coefficients des quenchings (droite).....	28
3.3	Schéma du spectrofluoromètre utilisé pour la mesure des spectres de fluorescence.....	30
3.4	Photo de dispositif pour générer les intensités lumineuses. L'intensité est ajustée par la distance séparant les lampes des végétaux (d). 1, 2 et 3 sont les lampes de serre utilisées.....	30
4.1	Variations des paramètres de la fluorescence chlorophyllienne $F'_0$ , $F'_M$ et $F_s$ en fonction de l'intensité de la lumière ambiante chez <i>Chenopodium album</i> (CA), <i>Echinochloa crus-galli</i> (EC) et le maïs <i>Monsanto</i> (M).....	36
4.2	Diminution de QP et augmentation de QN avec l'augmentation de l'intensité lumineuse chez <i>Chenopodium album</i> (CA), <i>Echinochloa crus-galli</i> (EC) et le maïs <i>Monsanto</i> (M).....	37
4.3	Diminution de ratio FBV/FR avec l'augmentation de l'intensité lumineuse chez <i>Chenopodium album</i> (CA), <i>Echinochloa crus-galli</i> (EC) et le maïs <i>Monsanto</i> (M).....	38
4.4	Insensibilité du ratio FR/FRL aux augmentations de l'intensité lumineuse chez <i>Chenopodium album</i> (CA), <i>Echinochloa crus-galli</i> (EC) et le maïs <i>Monsanto</i> (M).....	39
4.5	Spectres normalisés pour le maïs Elite (E) sous I2 avant tri (E1 spectre normal, E6 spectre anormal).....	44
4.6	Spectre d'émission des lampes Oriels mesuré par le spectrographe .....	46
4.7	Loadings pour Monsanto sous I1 avant tri des données.....	46

4.8	Composantes des échantillons sur le premier et le troisième axe du modèle ACP construit sur le maïs <i>Monsanto</i> sous I1 avant tri des données.....	47
4.9	Spectres normalisés pour Monsanto sous I1 avant tri .....	47
4.10	Moyenne par groupe de plantes des spectres acquis à $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .....	50
4.11	Comparaison des spectres moyens avant (haut) et après normalisation (bas). L'abscisse donne les longueurs d'onde en nm et l'ordonnée l'intensité de la fluorescence en unités quelconques.....	51
4.12	Moyenne par espèces/hybrides des spectres acquis à $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Bleu : maïs; rouge : mauvaises herbes monocotylédones; vert : mauvaises herbes dicotylédones.....	52
4.13	Composantes des échantillons sur le premier axe du modèle ACP construit sur le maïs.....	55
4.14	Vecteur propre de la première composante principale pour le sous-modèle du maïs et spectre moyen associé .....	56
4.15	Composantes des échantillons sur le premier axe du modèle ACP construit sur les mauvaises herbes monocotylédones.....	57
4.16	Vecteur propre de la première composante principale pour le sous-modèle des mauvaises herbes monocotylédones et spectre moyen associé.....	58
4.17	Composantes des échantillons sur les deux premiers axes du modèle ACP construit sur les mauvaises herbes dicotylédones.....	59
4.18	Vecteurs propres des deux premières composantes principales pour le sous-modèle des mauvaises herbes dicotylédones et spectre moyen associé.....	60
4.19	Variation des spectres moyens de trois groupes de plantes en fonction de l'intensité lumineuse. Les courbes d'une même couleur correspondent aux différentes intensités lumineuses .....	62
4.20	Vecteurs propres des sous-modèles pour des modèles SIMCA étalonnés aux 4 intensités lumineuses. Filtre standard sur les données.....	67
4.21	Vecteurs propres des sous-modèles pour des modèles SIMCA étalonnés aux 4 intensités lumineuses. Filtre sur 95 nm appliqué aux données.....	68
4.22	Spectres moyens des trois groupes des plantes cultivées sous conditions contrôlées et sous conditions naturels au champ .....	70

## LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

ACP	Analyse en Composantes Principales
ADL	Analyse Discriminante Linéaire
ATP	Adénosine Triphosphate
DCMU	3-(3,4-dichlorophenyl)-1, 1-diméthyl urée
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
FB	Fluorescence bleue
FBV	Fluorescence bleu-vert
FChl	Fluorescence chlorophyllienne
FMN	Flavin Mononucléotide
FR	Fluorescence rouge
FRL	Fluorescence rouge lointain
FV	Fluorescence verte
$F_0$	Niveau minimal de la fluorescence (constante), chez une plante adoptée à l'obscurité
$F'_0$	Niveau minimal de la fluorescence (constante), chez une plante adoptée à la lumière
$F_M$	Niveau maximal de la fluorescence, chez une plante adoptée à l'obscurité
$F'_M$	Niveau maximal de la fluorescence, chez une plante adoptée à la lumière
$F_S$	Niveau stable de la fluorescence
$F_v$	Fluorescence variable, c'est la différence entre $F_M$ et $F_0$ ( $F_M - F_0$ )
$F_T$	Fluorescence terminale
PAM	Pulse-Amplitude-Modulation
PSII	Photosystème II

PSI	Photosystème I
QA	Plastoquinone A, accepteur primaire d'électrons
QN	Quenching ou atténuation non-photochimique
QP	Quenching ou atténuation photochimique
$\Phi P$	Rendement photochimique



## **CHAPITRE 1**

### **INTRODUCTION**

#### **1.1 Introduction : contexte et problématique générale**

Dans cette première partie de l'introduction vise à donner une idée sur l'utilisation des pesticides ainsi les approches et les méthodes développées pour réduire l'utilisation des pesticides dans les champs.

##### **1.1.1 Vers une réduction de l'utilisation des herbicides dans les champs**

Au Canada, les ventes de pesticides en 2003 ont atteint 1.01 milliard \$, en hausse de 3 % par rapport à 2002 (Anonyme, 2004). Malgré leurs avantages pour l'agriculture, l'utilisation des pesticides cause de nombreux préjudices. En plus de leurs dangers pour la santé humaine, les pesticides se retrouvent dans les eaux de surface et souterraines (Carter *et al.*, 2000), entraînant la dégradation des habitats et des écosystèmes par la perte de la biodiversité, la dégradation de la qualité de l'eau et des ressources halieutiques et l'émergence d'espèces nuisibles résistantes (Boutin *et al.*, 2000). Face à ces dangers, plusieurs pays dont la France, l'Allemagne et la Suisse ont adopté des programmes de réduction de l'utilisation des pesticides. Au Canada, très peu d'initiatives gouvernementales ont été prises jusqu'à présent.

La classe des pesticides la plus importante est de loin celle des herbicides, qui représentent environ 77 % des pesticides vendus. Cependant, l'élimination des herbicides dans l'agriculture causerait des pertes de culture pouvant atteindre plus de 90 % (Le Bourgeois *et al.*, 2001), ce qui se traduirait par de graves problèmes économiques et humains. Tout programme de réduction de l'utilisation des herbicides doit donc assurer la protection de l'environnement agricole tout en maintenant la productivité des cultures, deux priorités de notre société.

Une des stratégies prometteuses menant à la réduction des herbicides repose sur

l'observation selon laquelle les mauvaises herbes ne sont pas distribuées uniformément au champ, mais se retrouvent souvent de façon agglomérée (Perry *et al.*, 2002; Thornton *et al.*, 1990). Par conséquent, une réduction de l'utilisation des herbicides est possible par leur application seulement aux endroits infestés par les mauvaises herbes plutôt qu'une application uniforme dans les champs. De cette façon, Miller *et al.* (2003) a rapporté une réduction d'herbicides entre 9 et 42 % dans une culture de céréale, selon les espèces des mauvaises herbes présentes. Timmermann *et al.* (2003) ont trouvé des réductions d'herbicides entre 30 à 94 % et par conséquent, un gain économique allant jusqu'à 42 €/ha. Chez le maïs, Medlin *et al.* (2000) ont trouvé une réduction d'herbicides de 77 à 84 %. En moyenne, le traitement localisé d'herbicides permet d'économiser 54 % par rapport à la quantité à utiliser pour le traitement généralisé sur tout le champ (Timmermann *et al.*, 2003). Ce pourcentage d'économie varie surtout selon le taux d'infestation du champ. Pour être rentable, l'économie d'herbicides appliquée de façon localisée doit compenser les coûts de la détection, du traitement des données, de l'identification, de la prise de décision et de l'application localisée d'herbicides.

### **1.1.2 Identification des mauvaises herbes**

Les opérations pour localiser et traiter des îlots de mauvaises herbes dans les champs peuvent s'effectuer par diverses techniques faisant partie de l'agriculture de précision. Tout d'abord, la technique de la cartographie consiste à identifier visuellement les îlots, les localiser à l'aide d'un GPS puis à construire une carte qui servira à l'application localisée des herbicides. Cependant, cette approche est exigeante en matériel et en personnel durant une très courte période de temps, ce qui limite grandement son utilisation. Par ailleurs, trois autres approches sont en cours de développement pour l'identification automatique des mauvaises herbes basée sur l'utilisation de capteurs optiques. La première est la vision artificielle, qui vise à identifier les plantes par leur aspect physique en se référant à un algorithme informatique. Cette technique a permis d'identifier les espèces d'après leurs formes (Woebbecke *et al.*, 1995; Yonekawa *et al.*, 1996) ou leurs textures (Meyer *et al.*, 1998). Cependant, cette technique devient inefficace lorsque la luminosité est irrégulière ou lorsque les feuilles des plantes se chevauchent. De plus, le temps nécessaire pour

identifier les plantes selon leurs textures est trop long et parfois il est très difficile d'identifier avec succès une plante par la forme ou la texture de ses feuilles à cause de l'arrière-plan (Chancellor *et al.*, 1993).

La deuxième technique optique vise à identifier les plantes selon leurs spectres de réflectance, c'est-à-dire les qualités spectrales de la lumière solaire réfléchiée par les végétaux (Moshou *et al.*, 1999; Noble *et al.*, 2002). Cependant, le fait que cette technique se base sur les caractéristiques optiques (couleurs des feuilles) et que la perception des couleurs est variable selon l'éclairage, son application au champ devient inefficace. De plus, la variabilité en âge et les états physiologiques des plantes au champ affectent le spectre de réflectance qu'elles émettent rendant cette technique moins robuste.

La troisième approche pour l'identification automatique des mauvaises herbes est la fluorescence, dont les spectres d'émission peuvent être considérés comme une signature spécifique permettant d'identifier les espèces végétales. Brièvement, l'excitation d'une feuille par des radiations UV induit l'émission de deux types distincts de fluorescence, une fluorescence bleu-vert (FBV) et une autre dans la zone du rouge-rouge lointain, la fluorescence chlorophyllienne (FChl). Déjà en 1985, Chappelle *et al.* ont démontré la possibilité de distinguer quatre groupes de végétaux (les herbacées monocotylédones, les herbacées dicotylédones, les arbres feuillus et les conifères) en se basant sur le ratio des FBV et FChl induites par UV. Plus tard, Johnson *et al.* (2000) ont caractérisé la FBV de 32 espèces, dont certains spectres étaient très différents. En 2001, Ounis *et al.* ont pu discriminer trois espèces (orge, blé et pois) cultivées au champ en utilisant le ratio de FChl (rouge lointain) induites à 532 nm et 355 nm.

Les études précédemment citées, quoique supportant le potentiel de la fluorescence des végétaux à discriminer différents groupes de végétaux ou espèces végétales, n'étaient cependant pas conçues de façon à discriminer des espèces cultivées telles que le maïs d'autres espèces susceptibles d'être présentes dans les champs et de diminuer les rendements. Récemment, une étude menée lors d'un projet de maîtrise à l'Université Laval a démontré le potentiel de l'analyse spectrale de la fluorescence des

végétaux à discriminer efficacement entre quatre hybrides de maïs et 8 espèces de mauvaises herbes représentatives du sud du Québec (Longchamps, 2006). Cette étude se distingue des précédentes par le grand nombre d'espèces (ou hybrides de maïs) discriminées et surtout par le fait que la discrimination se faisait à partir de l'utilisation non pas de simples ratios de fluorescence (ex. FBV/FChl) mais plutôt de la totalité du spectre de la fluorescence induit par une excitation UV. Ainsi, les intensités de fluorescence à chaque longueur d'onde des spectres d'émission étaient considérées comme des variables et furent traitées par des analyses statistiques multivariées, soit par l'analyse en composantes principales puis par l'analyse discriminante linéaire (ACP et ADL). Par cette approche, Longchamps *et al.* (2006) ont pu discriminer entre quatre hybrides de maïs et quatre espèces de mauvaises herbes monocotylédones et quatre autres espèces de dicotylédones. Le taux de succès de discrimination a été de 93 à 98 % et l'erreur de prédiction variait entre 7.1 et 8.2 % respectivement pour ACP et ADL selon la discrimination par classe (maïs, mauvaises herbes monocotylédones et mauvaises herbes dicotylédones).

Malgré les résultats encourageants de l'étude de Longchamps, beaucoup de travail reste à faire avant de les appliquer sous des conditions réelles au champ. En effet, les mesures de fluorescence ont été réalisées dans cette étude sous des conditions contrôlées en serre avec des plantes cultivées dans des chambres de croissance. Or, la signature spectrale de la fluorescence des feuilles d'une espèce végétale est déterminée par leurs caractéristiques intrinsèques, qui elles dépendent en partie des conditions environnementales à moyen terme lors de la croissance ainsi que des conditions ambiantes à court terme, lors des mesures de fluorescence (Buschmann *et al.*, 2000; Lichtenthaler *et al.*, 1997; Cerovic *et al.*, 1999). Ainsi, les plantes cultivées au champ ont des signatures (spectre d'émission) de fluorescence différentes de celles cultivées en chambre de croissance. Par exemple, l'intensité de la FChl par rapport à celle de la FBV est beaucoup plus faible chez des plantes cultivées à l'extérieur que chez celles cultivées à l'intérieur. Cette différence s'explique par l'accumulation dans l'épiderme des feuilles de composés ayant pour fonction de bloquer la pénétration des rayons UV naturels du soleil et protéger les cellules du mésophylle contre leurs effets néfastes (Lichtenthaler *et al.*, 1997, Burchard *et al.*, 2003). Ainsi, les rayons UV utilisés pour induire la

fluorescence des végétaux seront en partie bloqués au niveau de l'épiderme et pourront donc moins exciter les molécules de chlorophylle situées dans le mésophylle. Aussi, les variations rapides de l'intensité de la lumière ambiante lors des passages nuageux peuvent influencer significativement les spectres d'émission de fluorescence des plantes, et ainsi, diminuer possiblement la capacité de la fluorescence à discriminer le maïs et les mauvaises herbes. Par conséquent, il est important de vérifier si les résultats de l'étude de Longchamps peuvent être reproduits avec des plantes d'extérieur exposées à différentes intensités lumineuses ambiantes, comme sous des conditions naturelles au champ.

### 1.1.3 Aperçu du projet de recherche

Pour répondre à cette question, nous avons poursuivi le travail de Longchamps (2006) en utilisant des conditions se rapprochant davantage de celles rencontrées au champ, avec les mêmes espèces mais cultivées à l'extérieur et soumises à des intensités lumineuses ambiantes variant lors des mesures de fluorescence. Dans la première partie, de travail nous avons caractérisé l'effet de l'intensité lumineuse ambiante sur les caractéristiques des spectres d'émission de la fluorescence chez trois espèces représentatives de chacun des groupes à discriminer, soit le maïs *Monsanto DKC 26-78* (M), *Echinochloa crus-galli* (EC), *Chenopodium album* (CA), représentant les groupes de maïs, mauvaises herbes monocotylédones et mauvaises herbes dicotylédones respectivement. L'effet de l'intensité lumineuse sur les caractéristiques spectrales de la fluorescence induite par UV (328 nm) a été déterminé en mesurant les variations de deux paramètres, les ratios des intensités de FBV et FChl (fluorescences rouge FR et rouge lointain FRL) FBV/FR et FR/FRL en fonction de l'intensité lumineuse ambiante, allant de 0 à 900  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Parallèlement à ces mesures, d'autres paramètres de fluorescence obtenus par un fluorimètre modulé selon la méthode des flashes saturants ont été mesurés tels que,  $F'_M$ ,  $F_S$ ,  $F_M$ ,  $F_0$  et  $F'_0$ . Ces derniers paramètres nous ont permis de quantifier les deux types de quenching photochimique (QP) et non photochimique (QN) de la fluorescence chlorophyllienne.

En deuxième lieu, nous avons déterminé l'efficacité de la signature spectrale de

fluorescence à discriminer les groupes de plante (maïs et mauvaises herbes monocotylédones et dicotylédones) cultivées à l'extérieur et soumises à différentes intensités de lumière ambiante (de 0 à 900  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) durant les mesures de fluorescence. Le potentiel discriminant de fluorescence a été évalué par la méthode de classification SIMCA.

En troisième lieu, nos données ont été comparées à celles de Longchamps *et al* (2006). Dans cette dernière étude, les plantes ont été cultivées en conditions contrôlées en cabinet de croissance. Nos données ont été obtenues à partir des plantes qui ont poussé à l'extérieur. Il a été donc intéressant de comparer les résultats obtenus avec ces 2 jeux de données pour voir si les conditions de croissance ont un impact sur le potentiel discriminant.

## 1.2 Les objectifs du projet

Pour étudier le potentiel de la signature spectrale de fluorescence à discriminer entre maïs et mauvaises herbes aux champs et pour élaborer une stratégie de classification visant à réduire au minimum l'erreur de prédiction, nous avons défini les objectifs suivants :

- Quantifier les impacts des variations de l'intensité lumineuse ambiante sur les spectres de fluorescence en reliant ces variations de spectres de fluorescence induites par la lumière ambiante aux variations des paramètres de FChl mesurés par un fluorimètre modulé selon la méthode de changements. Ces paramètres quantifient les proportions de l'énergie absorbée qui est utilisée à des fins photochimiques ou bien dissipée sous forme chaleur (voir section 2.3.2).
- Déterminer l'efficacité de la signature spectrale de fluorescence induite par excitation UV à discriminer les trois groupes des plantes (maïs et mauvaises herbes monocotylédones et dicotylédones) cultivées à l'extérieur et soumises à différentes intensités de lumière ambiante.

- Comparaison des résultats de classification – plantes cultivées à l'extérieur et mesure sous lampe versus plantes cultivées en cabinet de croissance et mesure en serre.

## CHAPITRE 2

### REVUE DE LITTÉRATURE

#### 2.1 La fluorescence : principes physiques et généralités

La fluorescence est un phénomène physique observé chez de nombreuses molécules, les fluorophores. Lorsque ceux-ci absorbent la lumière (radiations UV ou visibles), leurs électrons sont temporairement portés à un niveau énergétique supérieur appelé état excité. Quand leurs électrons regagnent leur niveau énergétique inférieur (état fondamental) en moins de quelques nanosecondes, une fraction de l'énergie d'excitation est ré-émise sous forme de photons (lumière). En général, l'intensité de la fluorescence est déterminée d'une part par l'énergie d'excitation absorbée (flux de photons absorbés) et d'autre part par le rendement quantique de la fluorescence ( $\Phi_F$ ), c'est-à-dire la proportion de l'énergie lumineuse dissipée sous forme de fluorescence où la chaleur représente l'autre voie majeure de dissipation de l'énergie absorbée.

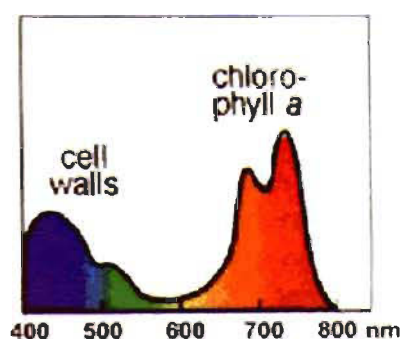
Pour la plupart des fluorophores, comme ceux responsables de la FBV chez les végétaux,  $\Phi_F$  est constant; l'énergie absorbée est dissipée sous forme de fluorescence et de chaleur dans des proportions constantes en autant que l'environnement moléculaire physicochimique ( $T^\circ$ , pH...) demeure inchangé.

Par contre, le  $\Phi_F$  de la fluorescence chlorophyllienne chez les végétaux peut subir de rapides et larges variations dépendantes de l'état de l'appareil photosynthétique. Cette dépendance sera expliquée en détail à la section (2.3.1). Pour l'instant, mentionnons que ces variations de  $\Phi_F$  découlent du fait que les électrons excités de la chlorophylle-*a* (suite à l'absorption d'un photon) peuvent retourner à leur niveau inférieur selon quatre possibilités (Raven *et al.*, 2000). La première possibilité est que l'énergie d'excitation, mais non les électrons, soit transférée du pigment excité à un pigment voisin, c'est le phénomène de la résonance. La deuxième possibilité est une dissipation de l'énergie en chaleur ( $\Phi_c$ ). La troisième possibilité est la réaction



photochimique primaire ( $\Phi_p$ ), i.e. la photooxydation d'un chlorophylle-*a* spéciale causant le transport d'électron à haute énergie à une molécule voisine (accepteur d'électron) qui fait partie d'une chaîne de transport photosynthétique d'électrons. La quatrième possibilité est une conversion de l'énergie en lumière, c'est la fluorescence ( $\Phi_F$ ). Ainsi, les variations de  $\Phi_F$  s'expliquent par des variations de l'utilisation de l'énergie absorbée (transfert, chaleur et photochimie) selon les fluctuations des activités de l'appareil photosynthétique, qui influencent l'absorption de la lumière, le transfert de l'énergie d'excitation jusqu'aux centres réactionnels des photosystèmes I et II. Ces derniers représentent le site des réactions photochimiques primaires responsables d'un transport d'électrons dans les thylacoïdes des chloroplastes qui résultent en la formation de NADPH et de l'ATP. Ces molécules chimiques sont utilisées pour la réduction du  $\text{CO}_2$  en sucres par le cycle de Calvin.

Tel que mentionné brièvement précédemment, la feuille peut émettre deux types distincts de fluorescence lorsqu'excitée par des rayons UV, soit la fluorescence bleu-vert (FBV) émise entre 400 et 630 nm et aussi entre 650 et 800 nm, la fluorescence chlorophyllienne (FChl), aussi appelée la fluorescence rouge et rouge lointain (Figure 2.1) (Chappelle *et al.*, 1984; Lichtenthaler *et al.*, 1997). Les origines, les caractéristiques et les facteurs influençant ces deux types de fluorescence sont discutés à la prochaine section.

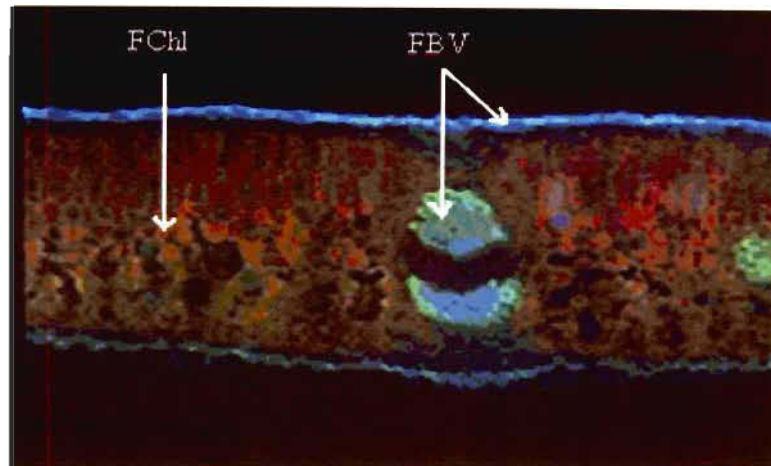


**Figure 2.1** Spectres d'émission de fluorescence induite par excitation UV et détectée à partir d'une feuille typique (Buschmann *et al.*, 2000)

## 2.2 La fluorescence bleu-vert (FBV) (400-630 nm)

La FBV est caractérisée par un pic dans le bleu (430-450 nm) et un épaulement dans le vert (520 à 530 nm) (Chappelle *et al.*, 1984; Corp *et al.*, 1997). La FBV détectée à partir d'une feuille intacte est émise principalement par les composés localisés dans les parois des cellules de l'épiderme et des faisceaux vasculaires (Chappelle *et al.*, 1985; Harris *et al.*, 1980; Ounis *et al.*, 2001) (Figure 2.2). La plupart de la FBV détectée provient de la surface de la feuille mais le mésophylle peut aussi contribuer avec un faible pourcentage (10 %) augmentant lorsque la concentration de chlorophylle diminue. De plus, la contribution du mésophylle est plus importante pour la FV que la FB due à sa plus faible ré-absorption par les molécules de chlorophylle. Par imagerie de fluorescence, il est possible de voir que les nervures émettent plus de FBV que de FChl, et l'inverse pour le limbe (Buschman *et al.*, 1998).

Pour ce qui est de l'origine de la FBV, celle détectée à partir de feuilles intactes provient principalement de composés phénoliques de la classe des acides hydroxycinnamiques dont les acides caféique, sinapique et férulique liés de façon covalente aux polysaccharides des parois cellulaires. L'acide férulique est le principal émetteur de la FBV (Lichtenthaler et Rinderle, 1998; Morales *et al.*, 1998; Cerovic *et al.*, 1999). D'autres composés peuvent contribuer de façon mineure (moins que 5 %) à la FBV lorsqu'ils sont excités par l'UV tels que les nicotinamides (NADPH, NADH), les flavines (FMN, FAD), des coenzymes (pyridoxal-5'-phosphate), pterines (acide folique) et plusieurs autres composés (Cerovic *et al.*, 1999). Sous excitation UV, la FBV induite reste constante à court terme (quelques minutes) car elle est indépendante de l'activité photosynthétique (Bongi *et al.*, 1991). Cependant, elle peut changer de façon importante à long terme (heures ou jours) suite à l'accumulation de composés fluorescents (Stober *et al.*, 1993; Bongi *et al.*, 1991). La FBV dépend des propriétés intrinsèques de la feuille (structure, concentrations des composés phénoliques et des chlorophylles), qui varient selon l'espèce, l'âge et les facteurs environnementaux (Buschman *et al.*, 1998; Lichtenthaler *et al.*, 1998) (voir section 2.4).



**Figure 2.2** Portion d'une coupe transversale d'une feuille de dicotylédone excitée par UV montrant l'origine de deux types de fluorescence. La FChl provient principalement des cellules de mésophylle tandis que la FBV détectée est émise principalement par les cellules de l'épiderme et des faisceaux vasculaires.

### 2.3 La fluorescence chlorophyllienne (FChl) (650-800 nm)

La FChl est caractérisée par deux pics, un dans le rouge (FR, près de 690 nm) et l'autre dans le rouge lointain (FRL, près de 740 nm). Contrairement à la FBV, la FChl provient uniquement de la chlorophylle-a contenue dans les chloroplastes des cellules du mésophylle, et aussi en une faible partie, des cellules de garde de l'épiderme (Figure 2.2).

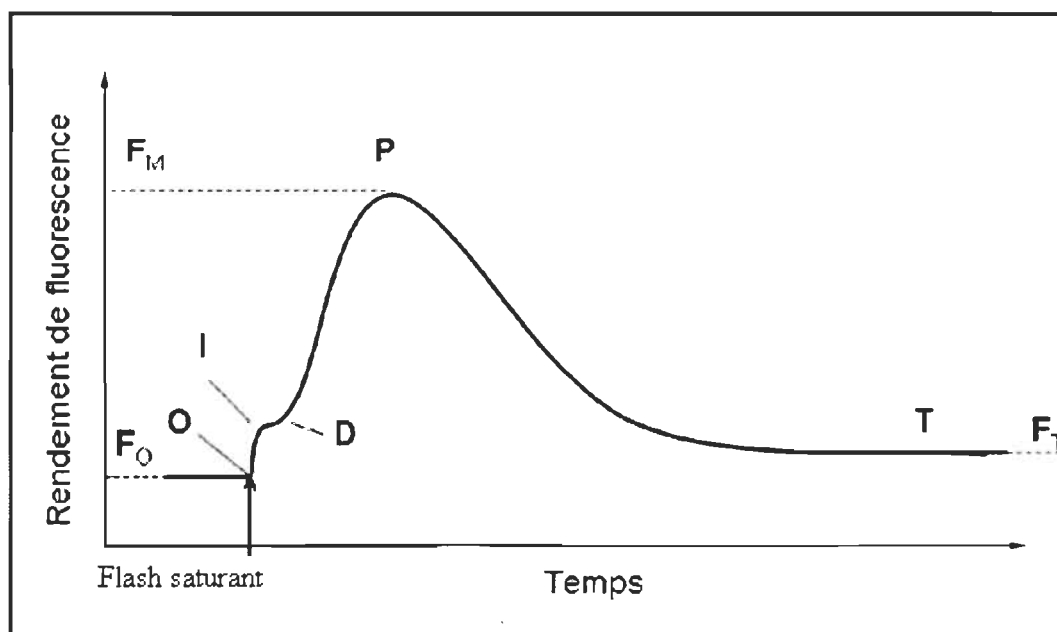
La plupart de la FChl provient du complexe photochimique, le photosystème II (PSII) (90 %). La portion restante provient du photosystème I (PSI) (Govindjee 1995; Krause *et al.*, 1991; Briantais *et al.*, 1986). Cependant, la contribution relative du PSI à la FChl varie selon la longueur d'onde d'émission, l'intensité de la fluorescence et le type de plante. Par exemple, à l'intensité minimale de fluorescence ( $F_0$  défini plus loin), le PSI contribue de 30 % au total de la FChl chez les plantes  $C_3$ . Ce pourcentage est de 50 % chez les plantes  $C_4$  (Pfundel *et al.*, 1998). Cependant, au niveau maximal de fluorescence ( $F_M$  défini plus loin dans le texte), la contribution de PSI à FChl est de 6 % et 12 % respectivement chez les plantes  $C_3$  et  $C_4$ .

La FChl est induite par un large spectre de longueur d'ondes d'excitation de l'UV jusqu'au rouge (Cerovic *et al.*, 1999). La FChl représente moins de 5 % de l'énergie absorbée par les pigments photosynthétiques. L'intensité de la FChl induite par UV dépend de plusieurs facteurs intrinsèques dont la transmittance UV de l'épiderme, la concentration de la chlorophylle, l'anatomie de la feuille, ces facteurs variant selon les conditions de croissance (détaillés plus loin dans la section 2.4). De plus, elle est variable en fonction du temps selon les variations rapides de l'activité photosynthétique de la plante. Cette large variation de la FChl peut fortement influencer son importance par rapport à la FBV et par conséquent, la signature spectrale de la fluorescence des végétaux. Il importe donc de bien comprendre les mécanismes impliqués dans les variations rapides de l'intensité de ce type de fluorescence.

### 2.3.1 Cinétique d'induction de la FChl (Courbe de Kautsky)

Une caractéristique qui distingue la FChl de la FBV est sa variation en fonction du temps. La cinétique de la FChl dépend des processus atténuateurs (ou Quenchings) et de l'état des photosystèmes (ouverts ou fermés) (Müller *et al.*, 2001). La variation dans le temps de l'intensité de fluorescence suite à un passage soudain à la lumière d'une plante adaptée à l'obscurité s'appelle la courbe de Kautsky, aussi courbe d'induction de la fluorescence (Tyystjarvi *et al.*, 1999) dont l'allure est présentée à la figure 2.3. Lors de l'éclairage par un flash saturant, la fluorescence augmente rapidement (entre 200 et 500 millisecondes) d'un niveau de fluorescence minimale ( $F_0$ ) à un niveau de fluorescence maximale ( $F_M$ ).  $F_0$  est le niveau de fluorescence où tous les accepteurs primaires d'électrons ( $Q_A$ ) du PSII sont oxydés et donc tous les centres réactionnels sont ouverts. Par conséquent, le maximum d'énergie d'excitation est utilisé pour la photochimie et la fluorescence est minimale. Le point O « Origine » est supérieur à zéro dû à une inefficacité inhérente du transfert d'énergie entre les pigments collecteurs de lumière et le centre réactionnel du PSII (Lazar *et al.*, 1999). Le plateau marqué par I « Inflexion » et D « Dip » est dû à l'atténuation de la fluorescence du PSII causée par le PSI par la réoxydation des plastoquinones ( $Q_A$ ) (Schreiber *et al.*, 1976). Le point P « Peak » marque le niveau maximal de la fluorescence chlorophyllienne, qui est égal à

$F_M$  lorsque le flash est saturant. Dans ce cas ( $F_M$ ), il correspond au niveau de fluorescence où tous les accepteurs primaires d'électrons ( $Q_A$ ) sont réduits et donc tous les centres réactionnels sont fermés. À ce moment, la probabilité que l'énergie d'excitation soit utilisée pour la photochimie est nulle, tandis que celles pour que l'énergie soit dissipée en chaleur ou par la fluorescence sont maximales. Il est important de noter que chez les feuilles dont les PSII sont pleinement fonctionnels, le passage de  $F_0$  à  $F_M$  représente une hausse de 600 % de l'intensité de la FChl (Maxwell *et al.*, 2000). Après le point P ( $F_M$ ), la fluorescence diminue vers un état stable ou terminal. C'est une étape lente (15 à 30 minutes) (Johnson *et al.*, 1990, Maxwell *et al.*, 2000). Au point T « Terminal » ( $F_T$ ) ou S « Stable » ( $F_S$ ) (selon les auteurs, la fluorescence est à un niveau stable, à l'équilibre, supérieur au niveau  $F_0$  et dépend à la fois de l'oxydation des ( $Q_A$ ) (ouverture des centres réactionnels) et de l'atténuation non-photochimique de la FChl due à l'augmentation de dissipation de l'énergie sous forme de chaleur.



**Figure 2.3** Aperçu de la courbe de Kautsky. Le rendement de la fluorescence chlorophyllienne est maximal ( $F_M$ ) lorsque tous les accepteurs d'électrons sont réduits et il est minimal ( $F_0$ ) lorsqu'ils sont oxydés. Le rendement de la fluorescence est aussi influencé par l'atténuation non-photochimique. Les points (O, I, D, P et T) sont des abréviations conventionnelles attribuées aux différents points de la courbe de Kautsky (Tyystjarvi *et al.*, 1999).

### 2.3.2 Atténuation de la fluorescence chlorophyllienne

La différence entre  $F_M$  et  $F_0$  représente la fluorescence variable ( $F_v$ ). La variation de ce paramètre en fonction du temps est due aux processus atténuateurs de la fluorescence ou « Quenching ». On distingue deux grands types d'atténuation de la FChl, les atténuations photochimiques et non-photochimiques.

#### 2.3.2.1 Atténuation (quenching) photochimique (QP) de la FChl

Suite à l'absorption d'un photon par un pigment photosynthétique, l'énergie d'excitation arrivée au centre réactionnel de PSII peut être utilisée pour la réaction photochimique, dissipée sous forme de chaleur ou remise sous forme de fluorescence. L'équation suivante résume la situation :

$$\Phi_P + \Phi_C + \Phi_F = 1$$

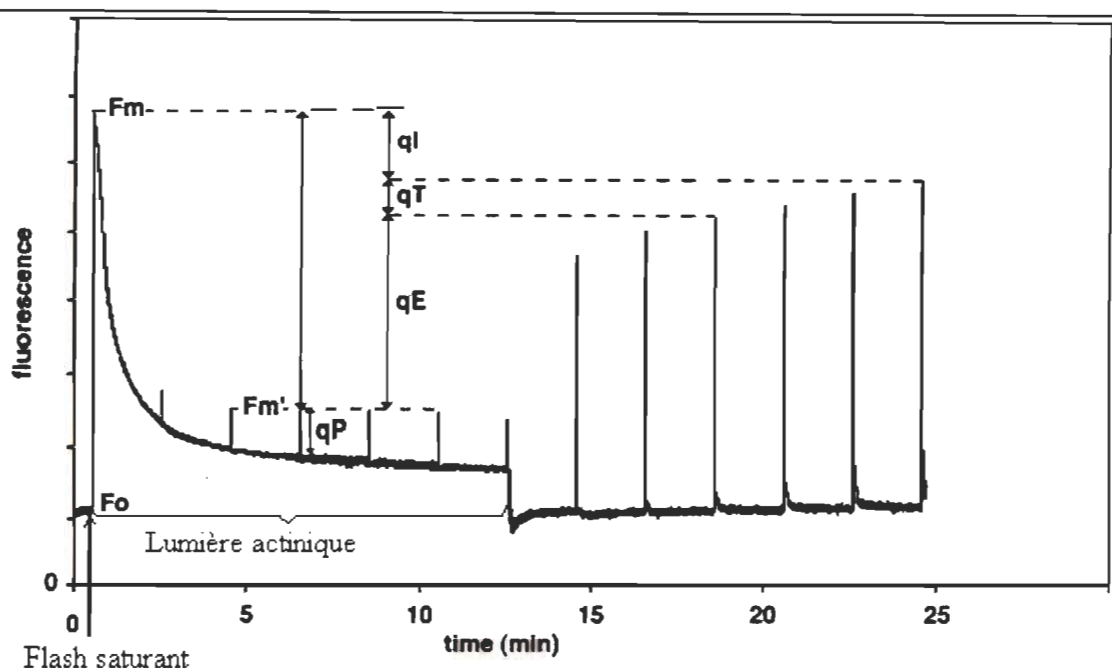
où  $\Phi_P$  est le rendement d'énergie d'excitation utilisée pour la photochimie,  $\Phi_C$  le rendement d'énergie transformée en chaleur et  $\Phi_F$  le rendement d'énergie transformée en fluorescence. Ces trois processus se trouvent en compétition et si l'un diminue, l'un ou les deux autres augmentent de façon complémentaire. L'atténuation photochimique est l'utilisation de l'énergie pour les réactions photochimiques. Ainsi, lorsque  $\Phi_P$  est maximal, tous les centres réactionnels sont ouverts et tous les accepteurs d'électrons dans les thylacoïdes sont oxydés (donc émissions de fluorescence et chaleur minimales). Ceci signifie que l'atténuation photochimique de la fluorescence chlorophyllienne (FChl) est maximale : la valeur du coefficient de quenching photochimique QP est alors maximum et égal à 1. Lorsque l'intensité lumineuse ambiante augmente ou, par exemple en présence d'inhibiteurs du PSII tels les herbicides diuron (DCMU) ou l'atrazine,  $\Phi_P$  diminue avec l'augmentation de pourcentage de  $Q_A$  réduits et devient nul lorsque la totalité de ces derniers sont réduits (tous les centres réactionnels sont fermés lors d'un flash saturant par exemple). Dans ce cas, l'atténuation photochimique de la FChl est minimale (QP tend vers zéro). En bref, l'atténuation photochimique (QP) de la FChl dépend de l'activité photosynthétique et de sa capacité à convertir de l'énergie en énergie chimique. Son augmentation dépend de l'augmentation de la vitesse des électrons au niveau de PSII due à l'activation par la lumière des enzymes impliqués dans le métabolisme de carbone et à l'ouverture de stomates (Maxwell *et al.*, 2000).



### 2.3.2.2 Atténuation (quenching) non-photochimique (QN) de la FChl

Le quenching non-photochimique (QN), c'est l'ensemble des processus qui dissipent l'excès d'énergie absorbée sous forme de chaleur. Son rôle principal est de protéger l'appareil photosynthétique contre les dommages causés par l'excès de lumière absorbée. En effet si l'énergie d'excitation excède la capacité de son utilisation par la photosynthèse, des composés nocifs pour la cellule comme les radicaux libres peuvent se former (Müller *et al.*, 2001, Johnson *et al.*, 1993). Pour assurer d'une part une efficacité photochimique maximale sous faible intensité lumineuse et d'autre part, une protection contre les photodommages, l'appareil photosynthétique activera des mécanismes de dissipation non-photochimique (i.e. sous forme de chaleur) de l'énergie absorbée lorsque cette dernière devient excessive par rapport à la capacité de la photosynthèse. Ces mécanismes forment le QN. Il existe trois différents mécanismes de QN, qui se distinguent par les mécanismes moléculaires impliqués et leurs différents temps de relaxation (Figure 2.4).

Le premier type est appelé qE pour « High energy state quenching ». Il contribue le plus au QN et il résulte de la conversion enzymatique de violaxanthine en zéaxanthine suite à l'acidification de lumen (Maxwell *et al.*, 2000; Horton *et al.*, 1996). Le deuxième type est qT pour « State transition ou transition d'état ». Il ne contribue que peu au QN. Il résulte de la phosphorylation réversible des protéines de complexe collecteur de la lumière associées aux PSII et optimise la distribution d'énergie lumineuse entre PSI et PSII (Maxwell 2000). Les deux premiers types se forment à la lumière en quelques secondes et se relaxent en quelques minutes (une à deux minutes) suite à la mise à l'obscurité. Le troisième type est nommé qI pour « Photoinhibition ». Son rôle est de protéger le PSII contre les dommages irréversibles (dégradation du complexe protéique et des chlorophylles). En effet, l'excès de lumière entraîne la formation de PSII inactifs où l'énergie lumineuse est transformée en chaleur. Cette voie est la deuxième en importance pour le QN et elle augmente lorsque qE devient insuffisant, provoquant l'accumulation des  $Q_A$  réduits (baisse de QP, hausse de la susceptibilité à la photoinhibition) (Cleland *et al.*, 1986). Ce dernier type se relaxe en une période plus longue et prend quelques heures pour s'annuler (Krause *et al.*, 1991).



**Figure 2.4** Courbe de fluorescence chlorophyllienne induite par une lumière actinique et des flashes saturants, montrant les différents types de quenching de la fluorescence chlorophyllienne d'une feuille d'*Arabidopsis*.  $F_0$  niveau minimal de la fluorescence,  $F_m$  niveau maximal de la fluorescence,  $F_m'$  niveau de la fluorescence suite à un flash saturant après un éclairage, QP quenching photochimique, ( $q_L$ ,  $q_T$  et  $q_E$ ) forme le quenching non-photochimique. Le retour à  $F_m'$  après quelques minutes suite à l'arrêt de l'éclairage témoigne du relâchement du  $q_E$  (Müller 2001).

## 2.4 Les facteurs qui affectent la signature spectrale de la fluorescence

Les caractéristiques du spectre de la fluorescence émis par une feuille dépendent de ses nombreuses propriétés intrinsèques (concentration des composés phénoliques et des chlorophylles, structure anatomique, ...) (Brugnoli *et al.*, 1992). Ces dernières varient selon son âge, son groupe taxonomique et les facteurs de l'environnement l'ayant influencée durant son développement. Le spectre d'émission de la fluorescence d'une feuille peut donc être considéré comme une signature spectrale spécifique. Pour bien interpréter cette signature, il est important d'avoir une idée de l'impact de ces facteurs sur la fluorescence des végétaux.



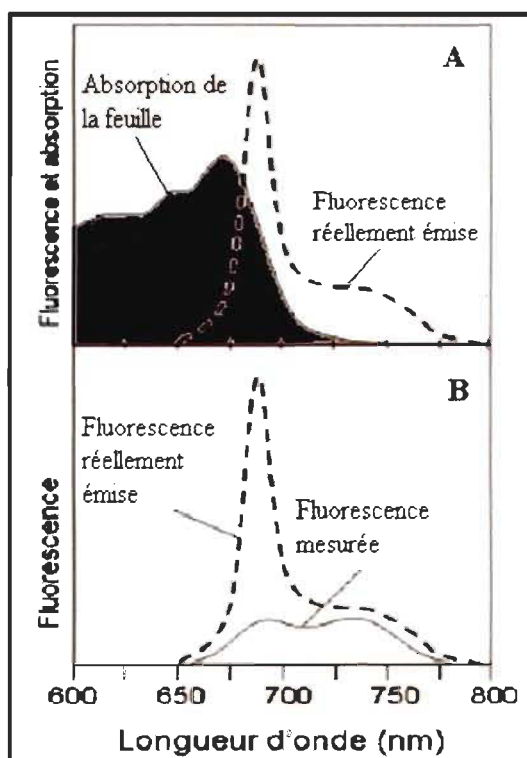
### 2.4.1 Les propriétés intrinsèques de la feuille

La composition et la concentration en fluorophores sont deux facteurs importants qui affectent directement la signature spectrale de la feuille. L'accumulation des composés phénoliques fluorescents (acides hydroxy-cinnamiques dont l'acide férulique) influence la signature spectrale par l'augmentation de la FBV. La concentration de ces composés varie selon les groupes taxonomiques. Ainsi, il est à noter que les graminées (dont le maïs) et plusieurs autres monocotylédones possèdent une plus forte concentration d'acide férulique et par conséquent une plus grande intensité de FBV par rapport aux plantes dicotylédones (Cеровic *et al.*, 1999).

La signature spectrale de la fluorescence est aussi influencée par la concentration des composés phénoliques non fluorescents dont les flavonoïdes. Pour se protéger contre les dommages qui peuvent résulter des rayons UV, l'épiderme des plantes extérieur, accumule des composés phénoliques. Cette accumulation augmente aussi avec l'âge (Meyer *et al.*, 2003). Les composés accumulés absorbent les radiations UV, mais ils n'émettent pas tous de la fluorescence (Burchard *et al.*, 2000). L'augmentation de concentration des composés phénoliques non fluorescents au niveau de l'épiderme des plantes d'extérieur par rapport aux plantes intérieures influence la signature spectrale en agissant sur la transmittance UV de l'épiderme. Les composés phénoliques fluorescents et non fluorescents accumulés dans l'épiderme forment une barrière qui absorbe les radiations UV et limite l'excitation de la partie intérieure (mésophylle) de la feuille, origine de la fluorescence chlorophyllienne (Gitelson *et al.*, 1998). Il en résulte une diminution de la FChl induite par excitation UV et par conséquent, l'augmentation du ratio FBV/FChl avec l'accumulation des composés phénoliques non fluorescents. En conclusion, les plantes d'extérieures émettent une plus faible FChl que les plantes d'intérieur et par conséquent ont un ratio FBV/FChl plus élevé. De plus, l'augmentation de la concentration des composés phénoliques fluorescents pourrait dans certains cas augmenter le ratio FBV/FChl.

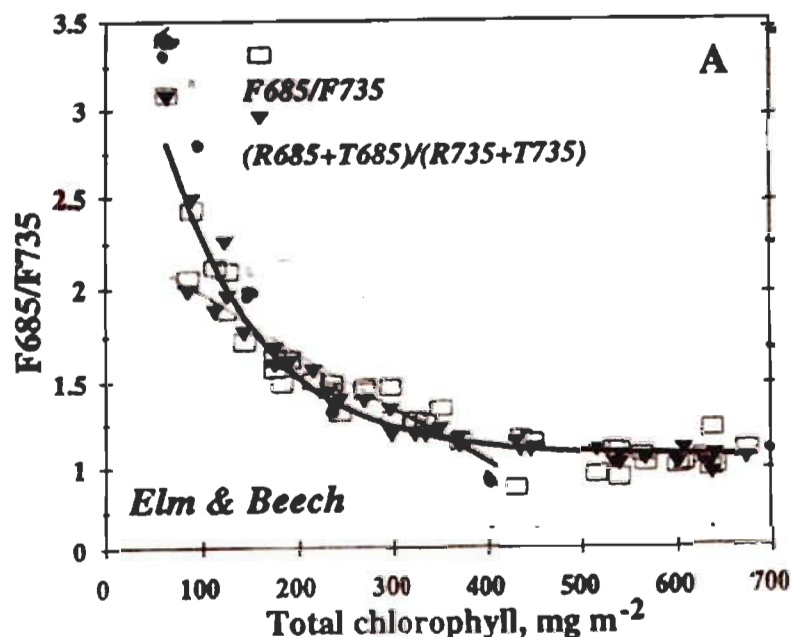
La concentration de la feuille en chlorophylles est l'autre facteur majeur qui influence la signature spectrale de la fluorescence en agissant sur les deux types de

fluorescence (FBV et FChl). Tout d'abord, les chlorophylles re-absorbent la FBV émise par les acides hydroxycinnamiques des parois cellulaires et par conséquent font diminuer la FBV provenant de mésophylle. Par ailleurs, les chlorophylles ré-absorbent préférentiellement la FR émise par la mésophylle et peu la FRL. Ceci est dû au chevauchement entre les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence dans la zone de FR (680 nm) (Figure 2.5 A). Ainsi une augmentation de la concentration en chlorophylle par exemple avec l'âge, se traduit par une augmentation de la réabsorption de la FR et peu de FRL, et donc par une baisse du ratio FR/FRL.



**Figure 2.5** Effet de la réabsorption de la fluorescence réellement émise sur le spectre mesuré de la fluorescence chlorophyllienne. A. Spectre d'absorption de la feuille et spectre de la fluorescence réellement émise. B. Comparaison de la fluorescence mesurée et celle réellement émise (Buschmann *et al.*, 1998)

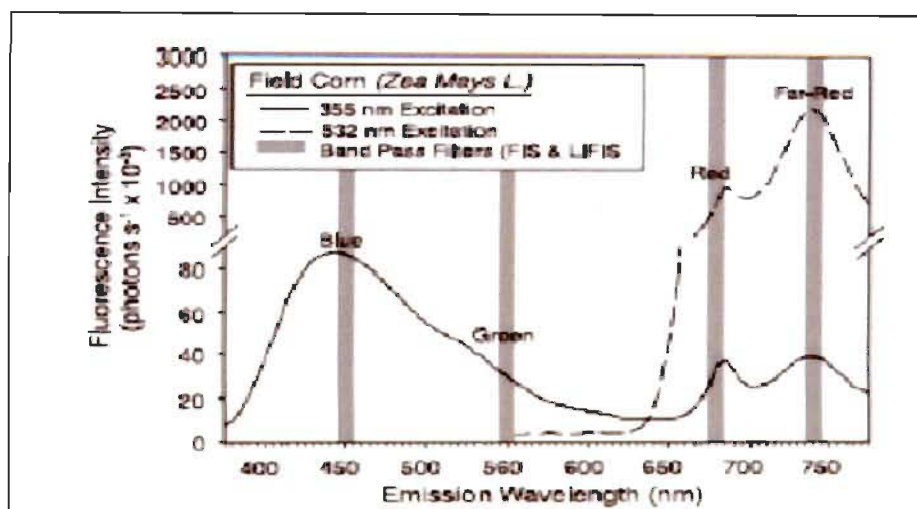
Il existe en fait une relation curvilinéaire inverse entre le ratio FR/FRL et la concentration de la chlorophylle, telle que démontré à la figure 2.6 (Gitelson *et al.*, 1998). Ainsi, l'augmentation de la concentration de la chlorophylle diminue la FR et fait diminuer le ratio FR/FRL.



**Figure 2.6** Relation curvilinéaire inverse entre le ratio  $F685/F735$  (□) et la concentration en chlorophylles dans des feuilles de hêtre et de bouleau (Adapté de Gitelson *et al.*, 1998)

#### 2.4.2 Longueur d'onde d'excitation

La signature spectrale de fluorescence d'une feuille dépend non seulement de ses propriétés intrinsèques mais aussi de facteurs tels la longueur d'onde d'excitation (UV et visibles). Les radiations UV d'excitation induisent les types de fluorescence, la FBV et la FChl, un exemple à la figure 2.7. La longueur d'onde d'excitation, UV a une large influence sur les intensités relatives des FBV et FChl : selon les spectres d'absorption des fluorophores impliqués dans l'émission de la FBV et la FChl, des longueurs d'onde tendant vers les UV-B (300 nm) induiront une FBV intense et une faible FChl tandis que l'inverse est observé pour une excitation UV-A tendant vers le bleu (ex. 380 nm). Selon Buschmann et Lichtenthaler (1998), une excitation près de 355 nm serait optimale pour induire à la fois les FBV et FChl.



**Figure 2.7** Spectre de la fluorescence émise sous deux longueurs d'ondes d'excitation par la face adaxiale d'une feuille de maïs cultivé à l'extérieur (355 et 532 nm) (Corp *et al.*, 2003)

En plus d'influencer les intensités relatives des FBV et FChl, la longueur d'onde d'excitation détermine les valeurs du ratio des intensités de deux pics de la FChl, soit les FR (690 nm) et FRL (740). Ainsi, la lumière bleue incidente est fortement absorbée par les caroténoïdes et les chlorophylles des cellules palissadiques de la partie supérieure du mésophylle de la feuille. La majeure partie de FChl excitée par la lumière bleue parcourt une faible distance dans la feuille qui correspond à l'épiderme supérieur et aux premières couches superficielles de mésophylle de la feuille. Il en résulte que la FR induite par excitation bleue est légèrement réabsorbée par la chlorophylle. Par conséquent le ratio FR/FRL est plus élevé que ceux induits par d'autres longueurs d'onde d'excitation.

L'excitation verte est beaucoup moins absorbée par les chlorophylles et par conséquent, elle pénètre plus profondément dans la feuille et peut atteindre la partie inférieure (mésophylle spongieux) de la feuille avant d'être absorbée et induire la FChl. La FR induite par l'excitation verte devra parcourir une plus grande distance dans la feuille et sera donc plus réabsorbée que le FR induite par les rayons bleus (Cui *et al.*, 1991). Il en résulte une diminution du ratio FR/FRL par rapport à l'excitation par les rayons bleus. Dans le cas d'excitation par le rouge, cette lumière est absorbée seulement

par les chlorophylles. La lumière d'excitation pénètre dans le mésophylle de la feuille plus que les rayons bleus et moins que les rayons verts. Il en résulte que la réabsorption de la FR avant de quitter l'épiderme supérieur est plus importante que lors de l'excitation par les rayons bleus et moins importante que par les rayons verts. Par conséquent, le ratio FR/FRL induit par une excitation rouge est moindre que celui induit par excitation bleue, mais supérieur à celui résultant de l'excitation verte.

### **2.4.3 Les facteurs environnementaux**

#### **2.4.3.1 L'intensité lumineuse ambiante**

L'intensité lumineuse ambiante lors des mesures de fluorescence agit surtout sur la FChl, et très peu sur la FBV à court terme. La lumière ambiante peut influencer les mécanismes de quenching de la fluorescence, soit augmenter le QN et diminuer le QP. L'importance relative de ces variations dépend de l'efficacité photosynthétique de la feuille. Dans le cas d'une hausse plus prononcée de QN que d'une baisse de QP, la diminution de FChl se traduit par une augmentation du ratio FBV/FChl.

De plus, le quenching non-photochimique QN induit en présence d'une forte lumière ambiante peut causer une baisse du ratio FR/FRL. En effet, le QN affecte principalement la fluorescence émise par le PSII, qui contribue d'avantage à la FR tandis qu'il affecte peu le PSI qui lui émet surtout la FRL. Il en résulte donc une baisse du ratio FR/FRL. Une autre raison qui explique la baisse de ce ratio par le QN est la réabsorption de la FR (F690). Cette dernière provient essentiellement des chloroplastes de la partie supérieure de la feuille (plus affectés par les fortes lumières) tandis que la FRL (F740) provient davantage des chloroplastes des couches plus profondes du mésophylle (moins affectés par les fortes lumières). Par conséquent, la RF est plus affectée que la FRL par les processus atténuateurs ou quenchings non-photochimiques qui se produisent à forte intensité lumineuse sous différentes formes telles que la photoinhibition.

En résumé, le qN formé sous fortes lumières augmente le ratio FBV/FChl et diminue le ratio FR/FRL. Ce processus est réversible lorsque l'intensité lumineuse diminue (Buschmann *et al.*, 2000; Ounis *et al.*, 2001).

### 2.4.3.2 Carences minérales

La plante a besoin de plusieurs éléments minéraux pour sa croissance et son développement. La déficience en ces éléments affecte aussi bien la croissance que la signature spectrale de fluorescence. La carence en N cause une augmentation de la concentration en composés phénoliques, ce qui diminue la transmittance UV de l'épiderme résultant en une baisse de la  $FChl_{UV}$  et donc une hausse du ratio FBV/FChl (Buschman *et al.*, 1998; Corp *et al.*, 1997; Chappelle *et al.*, 1984; Heisel *et al.*, 1996; Mercure *et al.*, 2004). D'autres études ont montré des effets de la carence en soufre opposés à ceux de la carence en azote, où le rapport FBV/FChl diminue (McMurtray *et al.*, 1994). Dans le cas d'une carence en potassium, celle-ci fait diminuer aussi le rapport FBV/FChl par une augmentation importante de la FChl mais il n'agit pas significativement sur la FBV (Chappelle *et al.*, 1984, Lichtenthaler *et al.*, 1988). Lors d'une carence en fer chez le maïs, Chappelle *et al.* (1984) ont montré que la FBV diminue. Des résultats opposés ont été observés par Morales *et al.* (1994) chez la betterave à sucre. Lors d'une carence en magnésium, Heisel *et al.* (1996) ont montré que le ratio FBV/FChl augmente de façon significative chez le maïs chez une feuille mature, mais pas chez une jeune feuille.

### 2.4.3.3 Le stress hydrique

Un autre facteur limitant de la croissance est le stress hydrique. Ce dernier peut affecter aussi la signature spectrale de fluorescence en augmentant le ratio FBV/FChl. L'effet de stress hydrique sur la signature spectrale de fluorescence varie selon la durée du stress (Cerovic *et al.* 1999). Ainsi, à court terme, les feuilles d'olive (*Olea europea L.*) montrent une augmentation de la FBV avec une augmentation plus importante pour la FV (F550) que pour la FB (F440) (Broglia *et al.*, 1993). Pour le maïs, le ratio FB/FR augmente réversiblement avec la durée de sécheresse (Dahn *et al.*, 1992). Ceci est dû à l'accroissement du QN durant la journée lors de période de sécheresse qui diminue le FR (Genty *et al.*, 1990). En conclusion, le stress hydrique modifie la fluorescence de trois façons. La première façon est le changement des propriétés optiques de la feuille (augmentation de la transmittance de l'UV) (Cerovic *et al.*, 1999). La deuxième façon

est l'accumulation des fluorophores qui émettent dans le bleu et le vert. La troisième est l'augmentation du pH apoplastique. Ce dernier permet l'augmentation de la fluorescence bleue au détriment de la fluorescence verte (Wollenweber *et al.*, 1981).

#### **2.4.3.4 La température**

Un autre facteur qui peut induire le stress chez les plantes est la température. Cette dernière varie beaucoup durant la journée ou durant la saison. L'effet de température sur la signature spectrale dépend de la plante, de la marge de température et du temps de traitement. En effet, une diminution de la température de 25 à 4 °C diminue les ratios FR/FRL et  $F_v/F_m$  (définis plus haut) chez les plantes non résistantes. Par contre, une légère augmentation du FR/FRL chez les plantes résistantes est observée (Agati *et al.*, 1996). Ces auteurs expliquent la diminution du ratio  $F_v/F_m$  due à la photoinhibition. Quant à la FBV, elle augmente de façon réversible avec une diminution de la température (Morales *et al.*, 1998) avec un taux de -5 à -3 % par degré de température °C. Agati *et al.* (1995) ont montré que le passage de la température d'une feuille de *Ficus benjamini* de 25 à 14 °C, diminue le ratio RF/FRL de 0.68 à 0.61. Par contre, la somme de la fluorescence chlorophyllienne (FR+FRL) augmente, quoique l'augmentation de la FRL est plus importante que celle de la FR. L'augmentation de FRL et de FR est due à la diminution de la fluidité de membrane thylacoïdale qui inhibe la réoxydation des plastiquinones (Havaux *et al.*, 1993). L'augmentation de la température de 40 à 50 °C fait augmenter la FChl de façon marquée. Alors, la FBV diminue de 60 % lorsque la température passe de 0 à 40 °C (Bongi *et al.*, 1994). Morales *et al.* (1998) ont montré que l'élément responsable de la diminution de la FBV suite à une augmentation de la température est situé au niveau de l'épiderme mais il n'est pas encore identifié.

#### **2.4.3.5 Attaque par les insectes**

Suite à une attaque par des insectes, la plante émet une forte FBV autour de la zone de la lésion causée par l'attaque. Cette augmentation est due à l'accumulation des composés qui émettent de la FBV (Cerovic *et al.*, 1999). Buschmann *et al.* (1998) ont

observé que suite à une attaque par des insectes, la feuille montre une forte augmentation de la FB et une légère augmentation de la FV alors que la FChl chute légèrement. Par conséquent, une forte augmentation du ratio FB/RF.

#### **2.4.3.6 Traitement par un herbicide**

Le traitement d'une plante par un herbicide fait varier son spectre de fluorescence. Le DCMU (Diuron) est un herbicide qui agit sur la photosynthèse en bloquant le transport d'électrons au niveau du site  $Q_B$  du photosystème II (Lichtenthaler *et al.*, 1997). Suite à un traitement par le DMCU, la FChl reste près de sa valeur maximale  $F_M$ . Puisque la FR contribue davantage à  $F_M$  que la FRL, il en résulte une augmentation du ratio FR/FRL (Lichtenthaler *et al.*, 1988). Quant à la FBV, elle reste constante. Par conséquent, il en résulte aussi une diminution des ratios FB/FR et FB/FRL mais le ratio FB/FV reste constant (Lichtenthaler *et al.*, 1997).



## CHAPITRE 3

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### 3.1 Matériel végétal

Les expériences ont été réalisées sur 7 espèces de mauvaises herbes annuelles et 4 hybrides de maïs. Ces onze plantes/hybrides appartiennent à trois groupes : 4 hybrides de maïs *Zea mays* L (Elite 60T05, Monsanto DKC 26-78, Pioneer 39Y85 (RR), Syngenta N2555 (BT, LL)), 4 espèces de mauvaises herbes annuelles monocotylédones (*Digitaria ischaemum* (Schreb), *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv., *Panicum capillare* (L.), *Setaria glauca* (L.) Beauv.) et 3 espèces de mauvaises herbes dicotylédones (*Amaranthus retroflexus* (L.), *Chenopodium album* (L.), *Capsella bursa-pastoris* (L.) Med.).

Les codes utilisés pour identifier les espèces et les hybrides de maïs sont présentés dans le tableau 3.1. Ces mauvaises herbes ont été choisies car elles sont communes du sud du Québec et souvent présentes dans les champs de maïs. Chaque espèce ou hybride a été répliqué 6 fois (3 graines par pot) et les spécimens formant un groupe homogène ont été choisis pour les mesures. Les plantes ont été cultivées dans des pots de 12.7 cm de diamètre et de 1.07 L de volume. Le support était composé en volume, de terre provenant de la région de l'Acadie-Québec (1/3) et de ProMixBX (2/3). Le terreau a été stérilisé avant les semis pour inhiber la germination d'autres mauvaises herbes. La fertilisation a été faite par une solution préparée par la combinaison de deux fertilisants PlantProd, A (20-8-20) et B (14-0-14). Dans un litre d'eau, il y avait 0,48 g de A et 0,43 g de B. La solution a été calibrée pour obtenir 150 ppm d'azote. Ensuite, les pots ont été codés et placés à l'extérieur des bâtiments du Centre de Recherche et de Développement (CRDH), Agriculture Canada, St-Jean-sur-Richelieu, QC pendant les mois de juin, juillet et août et l'arrosage a été fait au besoin. Après les semis, les pots ont été vérifiés quotidiennement et la date de chaque émergence a été notée.

**Tableau 3.1**  
Matériel végétal utilisé pour l'expérimentation

Groupe de plante	Nom commercial ou scientifique	code
Maïs	<i>Elite 60T05</i>	E
	<i>Monsanto DKC 26-78</i>	M
	<i>Pioneer 39Y85</i>	P
	<i>Syngenta N255</i>	S
Mauvaises herbes (Mono)	<i>Digitaria ischaemum</i>	DI
	<i>Echinochloa crus-galli</i>	EC
	<i>Panicum capillare</i>	PC
	<i>Setaria glauca</i>	SG
Mauvaises herbes (Dico)	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	AA
	<i>Amaranthus retroflexus</i>	AR
	<i>Chenopodium album</i>	CA
	<i>Capsella bursa-pastoris</i>	CB

### 3.2 Mesure des coefficients de quenching

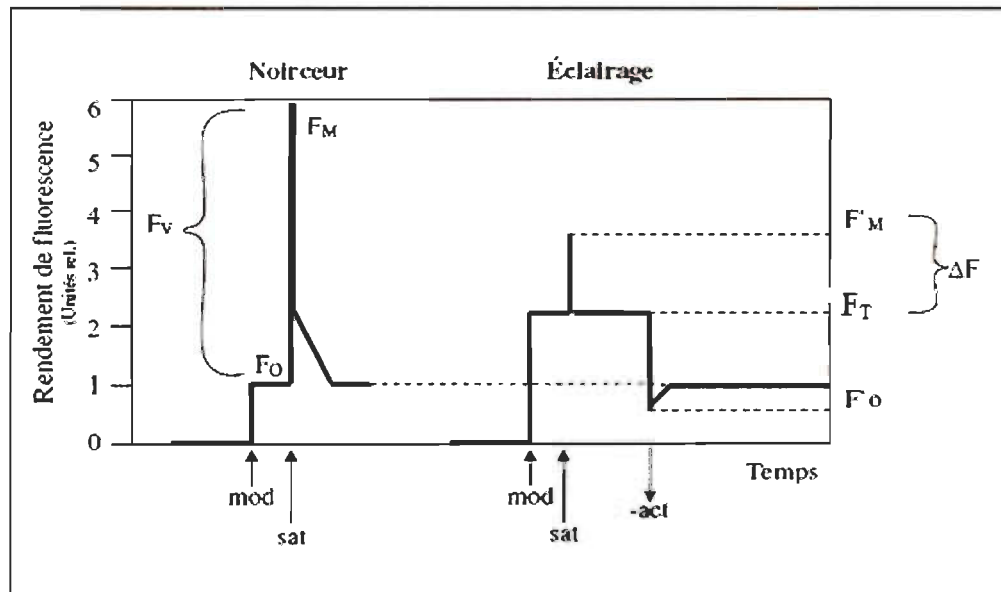
Les coefficients de quenching photochimique et non-photochimique de la fluorescence chlorophyllienne ont été mesurés à l'aide d'un fluoromètre Xénon-PAM (Walz, Effeltrich, Allemagne) selon la méthode des flashes saturants (Maxwell *et al.*, 2000, Schreiber, 2000) (Figures 3.1 et 3.2). Pour chaque plant des 3 hybride/espèces (*Monsanto DKC 26-78*, *Echinochloa crus-galli*, *Chenopodium album*) utilisés dans cette expérience, la plus jeune feuille mature, i.e. entièrement formée et orientée horizontalement, a été utilisée par les mesures de fluorescence. Celles-ci ont été effectuées après une période de 30 minutes à l'obscurité, après 20 minutes d'acclimatation pour la première intensité ( $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) puis après 5 minutes pour les intensités suivantes ( $600$  et  $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Toutes les mesures ont été effectuées au même endroit sur la feuille. À la fin de chaque période d'obscurité ou d'illumination suivant l'acquisition des spectres (voir section suivante), les niveaux de fluorescence  $F_0$

et  $F_T$  (ou  $F$  ou encore  $F_S$  selon les auteurs) ont été mesurés respectivement. Ensuite, la feuille était soumise à un flash saturant (1 seconde) pour induire  $F_M$  ou  $F'_M$  (à l'obscurité et à la lumière respectivement). Chez les feuilles exposées à la lumière, le flash saturant était suivi d'une courte illumination (3-5 secondes) de lumière rouge lointain pour induire le niveau  $F'_0$ . Ces niveaux de fluorescence ont permis de calculer les coefficients de quenching photochimique et non-photochimique selon respectivement les équations (1) et (2) ci-dessous.

$$QP = (F'_M - F_S) / (F'_M - F'_0) \quad (1)$$

$$QN = 1 - (F'_v / F_v) \quad (2)$$

Où  $F'_v = F'_M - F'_0$ ,  $F_T$  ou  $F_S$  = niveau stationnaire de la fluorescence,  $F_0$  = niveau minimal de la fluorescence (constante) mesuré à l'obscurité,  $F_M$  = niveau maximal de la fluorescence,  $F_v$  = fluorescence variable,  $F'_M$  = fluorescence maximale sous éclairage saturant,  $F'_0$  = niveau minimal de la fluorescence (constante) après la ré-oxydation complète des  $Q_A$  par illumination rouge lointain.



**Figure 3.1** Cinétique de fluorescence pour une feuille adaptée à l'obscurité et une autre adaptée à la lumière. mod = lumière modulée, sat = lumière saturante, -act = lumière actinique éteint,  $F_0$  = niveau minimal de la fluorescence (constante),  $F_M$  = niveau maximal de la fluorescence,  $F_v$  = fluorescence variable,  $F'_M$  = fluorescence maximale à l'éclairage (fluorescence maximale moins la lumière utilisée par autres voies de dissipation d'énergie),  $F'_0$  = niveau minimal de la fluorescence induit sous lumière rouge lointain pour ré-oxyder tous les  $Q_A^-$  en  $Q_A$  (Lambers *et al.*, 1998)



**Figure 3.2** Photo du spectrofluorimètre utilisé pour la mesure des spectres de fluorescence (gauche) ainsi que du fluorimètre modulé Xénon-PAM pour la mesure des coefficients des quenchings (droite)

### 3.3 Mesure des spectres de fluorescence

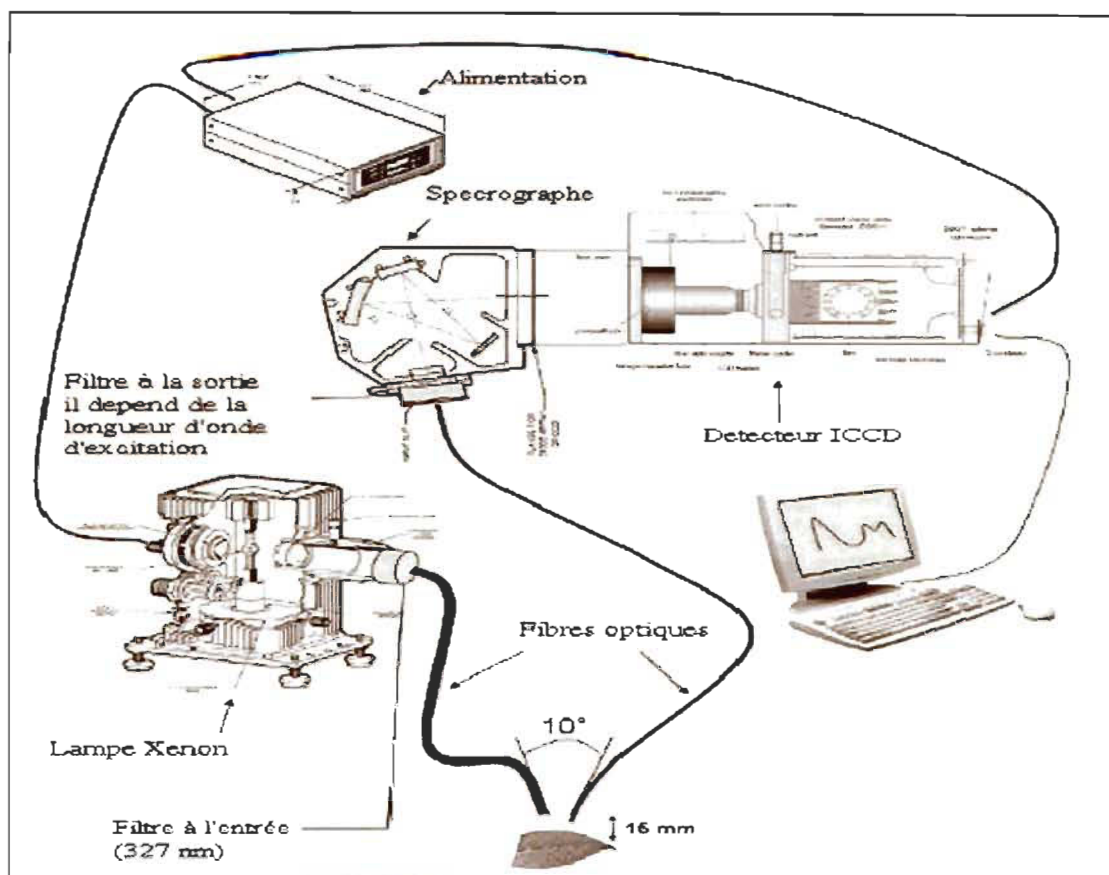
Les mesures de spectres de fluorescence ont été prises à l'aide d'un spectrofluorimètre dont le schéma est présenté à la figure 3.3. La fluorescence des plantes a été induite par une impulsion provenant d'une lampe au xénon (Spectra-physics Series Q Housing 60000 avec une lampe à arc au xénon donnant jusqu'à 5J par impulsion) contrôlée par un générateur (Oriel 68826) permettant des impulsions d'une durée de 9  $\mu$ s. La lumière d'excitation voyageait dans un faisceau de fibres optiques (Oriel 77578). Le faisceau était couplé à la lampe par une lentille de condensation (Oriel 60076) et un filtre passe-bande à 327 nm (20 nm FWHM). La fluorescence induite était acheminée au spectrographe par un autre faisceau de fibres optiques (Oriel 77532). Le faisceau d'excitation et le faisceau collecteur étaient fixés sur un support muni d'une jauge de profondeur pour placer l'extrémité des fibres à une distance constante de 5 mm de la cible. Les deux fibres pointaient vers le même point sur la cible, la zone éclairée ayant 2.3 mm de diamètre. Le spectrographe (Oriel MS125 1/8 m) a été modifié pour insérer un filtre passe-haut (400 nm) à l'entrée pour enlever les effets de deuxième ordre.

À la sortie du spectre, une caméra ICCD enregistrait le spectre (Andor, DH 712-18F/03, 5NS, Phosphore P43). Le spectrofluorimètre a été calibré à l'aide d'une source étalonnée (Ocean Optics, LS-1-CAL) pour corriger les distorsions induites par l'instrument de mesure. Le spectre résultant s'étend sur une bande de 400 à 760 nm répartie sur 378 canaux (0.955 nm/canal).

Les mesures ont été faites à la lumière ambiante en utilisant la technique de Norikane et Kuruta (2001). Sous lumière ambiante et sans faisceau d'excitation, 11 spectres étaient enregistrés à une fréquence de 10 Hz et le spectre moyen était calculé. Par la suite, 11 autres spectres étaient enregistrés suite à l'excitation UV et leur moyenne calculée. La synchronisation entre l'impulsion d'excitation et la capture du spectre était réalisée grâce au système électronique de synchronisation faisant partie de la caméra. La différence entre le spectre moyen avec excitation UV et celui sans excitation UV donnait le spectre de fluorescence. Un filtre (moyenne mobile sur 10.5 nm) était appliqué aux spectres moyens avant soustraction.

Les mesures ont été faites dans une salle de lecture sous 4 intensités lumineuses (0, 300, 600 et 900  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). L'éclairage était fourni par trois lampes de serre (Sun Master Natural de Luxe METAL HALIDE) avec une lumière équilibrée à 4000 Kelvin (Figure 3.4). Les différentes intensités lumineuses ont été obtenues en variant la hauteur des lampes au-dessus des plants. Cette hauteur était mesurée à partir de la hauteur moyenne de tous les plants. L'intensité de lumière a été mesurée par un détecteur (LI-COR, QUANTUM SENSOR SA190) et un enregistreur (LI-COR LI-1000). Lors d'un changement d'intensité lumineuse, on a laissé 20 minutes pour que les plantes puissent s'acclimater. Les mesures ont été faites en commençant par la plus faible intensité, c'est-à-dire à l'obscurité.





**Figure 3.3** Schéma du spectrofluorimètre utilisé pour la mesure des spectres de fluorescence



**Figure 3.4** Photo de dispositif pour générer les intensités lumineuses. L'intensité est ajustée par la distance séparant les lampes des végétaux (d). 1, 2 et 3 sont les lampes de serre utilisées.

### 3.4 Acquisition et traitement des données

Deux lots de spectres ont été pris. Le premier lot de spectres a été utilisé pour calculer les ratios de fluorescence FBV/RF et FR/FRL. Ces spectres ont été mesurés à partir des mêmes plantes et en même temps que les mesures servant à mesurer les coefficients de quenching chez 3 espèces représentatives des 3 groupes à discriminer : (*Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv (EC); *Chenopodium album* (L.) (CA) et le maïs *Monsanto DKC 26-78* (M)). Le deuxième lot de spectres a été utilisé pour développer des modèles de discrimination basés sur les 11 espèces présentées au tableau 3.1.

Les données brutes de trois campagnes de mesure similaires ont été visualisées à l'aide des programmes dédiés développés sous le logiciel Matlab<sup>TM</sup>. Deux sélections de données, une visuelle et une autre basée sur l'analyse en composantes principales, ont été appliquées pour éliminer les spectres anormaux (plus détaillé à la section 4.2). À la fin, on arrive à 140 spectres pour l'étude de l'effet de l'intensité lumineuse sur la fluorescence mesurée (3 campagnes, 3 espèces, 4 pots, 4 intensités lumineuses) et 305 spectres pour la discrimination entre les mauvaises herbes et le maïs (3 campagnes, 11 espèces, 4 pots pour chaque espèce, 4 intensités lumineuses).

Les spectres utilisés pour la discrimination entre le maïs et les mauvaises herbes ont été normalisés en divisant chaque spectre par sa moyenne. Cette normalisation enlève toute l'information sur l'intensité de la fluorescence. Ceci permet d'éliminer la variabilité de l'amplitude du spectre due à plusieurs facteurs (distance fibre optique-feuille et angle du faisceau de la lumière d'excitation par rapport à la surface de la feuille). Ainsi l'analyse n'est basée que sur la forme des spectres.

Les trois types de fluorescence, la FBV, la FR et la FRL ont été déterminés à partir des spectres non normalisés. Les FBV, FR et la FRL sont respectivement, le maximum de fluorescence de longueur d'onde situé dans l'intervalle [445 – 25; 445 + 10 nm], [685-10; 685 + 10 nm] et [735 – 10; 735 + 15 nm].

### 3.5 La méthode de classification SIMCA

La méthode de classification SIMCA est basée sur des modèles en composantes principales qui sont établis séparément pour chaque classe (Wise *et al.*, 2004). Pour classer un échantillon, on lui appliquera chacun des modèles en composantes principales. L'échantillon est attribué à la classe correspondant au modèle donnant la meilleure description de l'échantillon suivant un critère de distance (voir plus bas). Ainsi, le modèle SIMCA incorpore des informations sur chaque classe à l'aide des modèles spécifiques de classe (Erikson *et al.*, 2000).

Pour établir un modèle SIMCA, il faut d'abord définir le nombre des composantes principales pour chacune des classes. Cela a été réalisé en énumérant tous les modèles possibles. Par exemple, pour une classification en trois classes, on peut faire varier le nombre de composantes principales entre 1 et 5 pour chacune des classes et tester les modèles associés par validation croisée de type « leave-one-out ». On a alors 125 modèles dans lesquels on choisit le plus performant. Les travaux précédents (Longchamps *et al.*, 2006) ont montré que des modèles incluant au plus 5 composantes principales sont adéquats lorsqu'on confond toutes les espèces. En groupant les espèces par classe, on s'attend à ce qu'un nombre réduit de composantes principales soit nécessaire.

Dans un modèle SIMCA, l'appartenance à une classe est basée sur une distance minimale. Pour un échantillon, on calcule une distance pour chacune des classes et la classe retenue est celle correspondant à la distance minimale. La distance qui a été utilisée comprend deux composantes dont on fait la somme vectorielle. La première est la distance à l'origine (i.e. centre de masse de la classe) dans l'espace défini par le modèle en composantes principales d'une classe. Cette espace a autant de dimensions ( $N_c$ ) que le nombre de composantes principales qui a été retenu. Cela représente une distance dans le cadre de référence du modèle ACP d'une classe. Cette distance au carré est le  $T^2$  de Hotelling pour l'échantillon (Wise *et al.*, 2004). L'autre composante est la distance de l'échantillon dans l'espace résiduel à l'espace défini par le modèle en composantes principales. Cet espace est de dimensions  $N - N_c$  où  $N$  est le nombre de



dimension des spectres bruts (i.e. 378) et il est orthogonal à l'espace du modèle à  $N_c$  composantes en vertu des propriétés de l'analyse en composantes principales. Cette distance est le manque de concordance avec le modèle (lack-of-fit) ou la somme des erreurs résiduelles au carré (Wise *et al.*, 2004). Pour le calcul de la distance, on normalise ces deux distances par leur intervalle de confiance à 95 %.

La performance de la méthode de classification sera évaluée à l'aide de matrices de confusions (Kohavi et Provost, 1998).

## CHAPITRE 4

### RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Dans la première partie de ce projet de maîtrise, nous avons tout d'abord caractérisé les effets de différentes intensités lumineuses sur les principaux paramètres de la fluorescence chlorophyllienne (FChl) tels que  $F'_0$ ,  $F'_M$  et  $F_S$  et sur les deux types de quenching de la FChl, photochimique (QP) et non photochimique (QN). Ces effets nous ont ensuite permis de mieux comprendre les variations de la signature spectrale de fluorescence induites par les différentes intensités lumineuses ambiantes par la mesure des ratios FBV/FR et FR/FRL. Puis, dans la seconde partie du projet, nous avons étudié le potentiel de signature spectrale à discriminer entre les groupes de plantes malgré les variations induites par les différentes intensités lumineuses ambiantes. Enfin, nous avons comparé nos résultats avec ceux de Langchamps (2006) obtenus avec des plantes cultivées sous conditions contrôlées.

#### **4.1 Variations causées par l'intensité lumineuse sur les spectres de la fluorescence émise par des plantes cultivées sous conditions naturelles au champ**

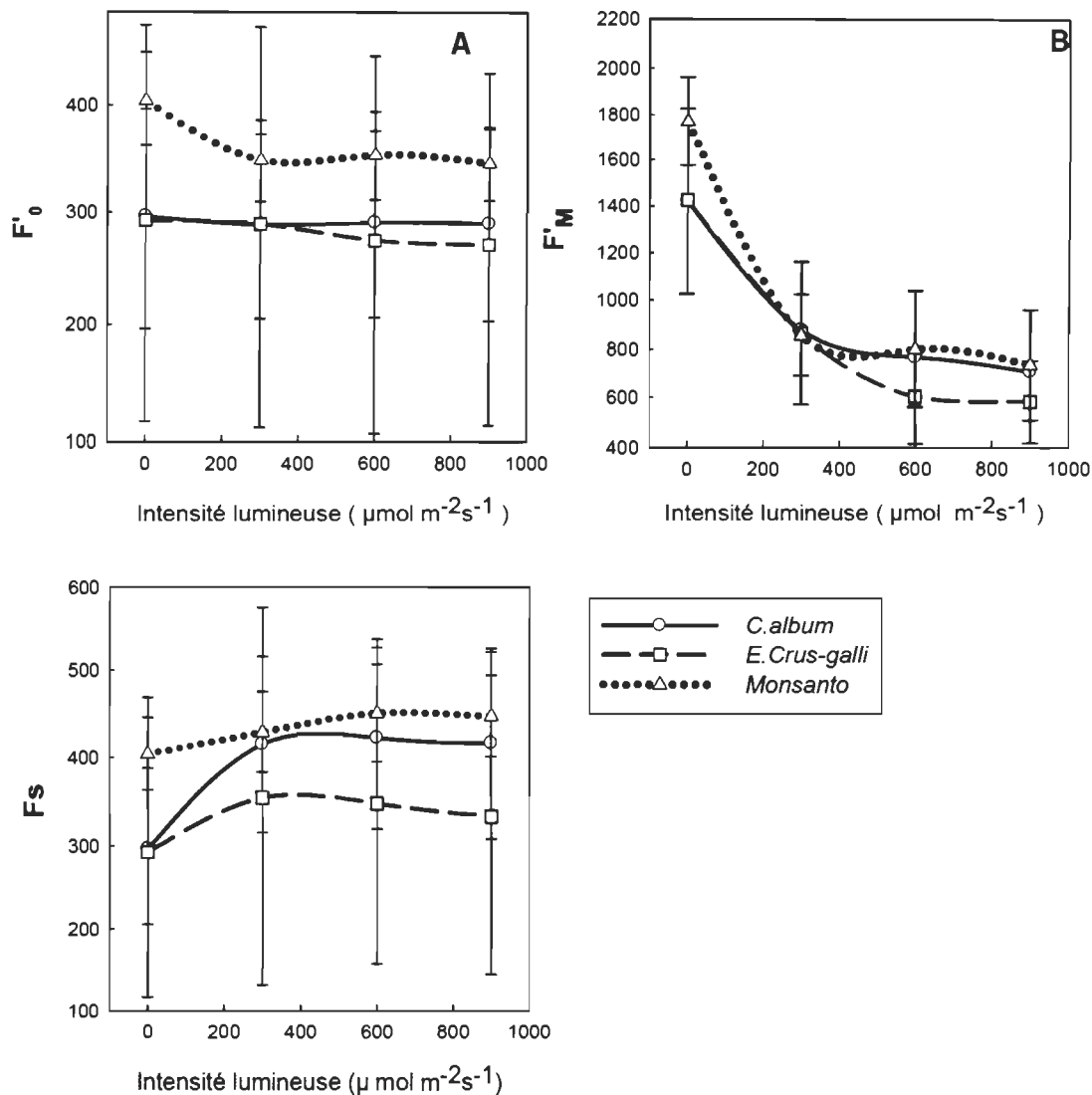
##### **4.1.1 Variation des paramètres de la fluorescence chlorophyllienne, $F'_0$ , $F'_M$ et $F_S$ en fonction de l'intensité lumineuse**

Afin de mieux caractériser les modifications des émissions de la fluorescence causées par les variations de l'intensité de la lumière ambiante lors de l'acquisition des spectres, nous avons donc mesuré les effets des différentes intensités sur les niveaux de fluorescence chlorophyllienne  $F'_0$ ,  $F'_M$  et  $F_S$ . Tout d'abord, chez la mauvaise herbe CA, les niveaux de fluorescence  $F'_0$  sont demeurés similaires au niveau  $F_0$  mesuré à l'obscurité (Figure 4.1. A). Chez la mauvaise herbe EC, les plus fortes intensités lumineuses ont causé une faible baisse de  $F'_0$  par rapport à  $F_0$  mesuré à l'obscurité (Figure 4.1. A). Par contre chez le maïs M, l'intensité minimale de la fluorescence diminue d'environ 12,5 % en passant de l'obscurité ( $F_0$ ) à  $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  ( $F'_0$ ) puis

reste constante malgré l'augmentation de l'intensité lumineuse. Il est à noter que les niveaux  $F_0$  et  $F'_0$  sont supérieurs chez le maïs M par rapport aux mauvaises herbes dicotylédones CA et monocotylédones EC.

Quant aux intensités maximales de la fluorescence  $F'_M$ , nous constatons que chez les trois espèces étudiées, les intensités  $F'_M$  diminuent fortement avec l'augmentation de l'intensité lumineuse et tendent à se stabiliser au-delà de  $600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Figure 4.1 B). À ces fortes intensités lumineuses, les valeurs de  $F'_M$  correspondent à moins de 50 % des valeurs maximales de  $F_M$  mesurées à l'obscurité. Il est à noter que la baisse de  $F'_M$  induite par de fortes lumières est relativement moins marquée pour CA.

Enfin, la figure 4.1 C montre que les intensités de fluorescence au niveau stationnaire (steady-state)  $F_s$  augmentent avec l'augmentation de l'intensité de la lumière ambiante. Chez les trois espèces étudiées, les valeurs de  $F_s$  augmentent entre 0 et  $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  puis demeurent stables à des intensités lumineuses supérieures. Par rapport à la valeur mesurée à l'obscurité (qui correspond en fait à  $F_0$ ), la plus grande augmentation de  $F_s$  est observée chez CA.



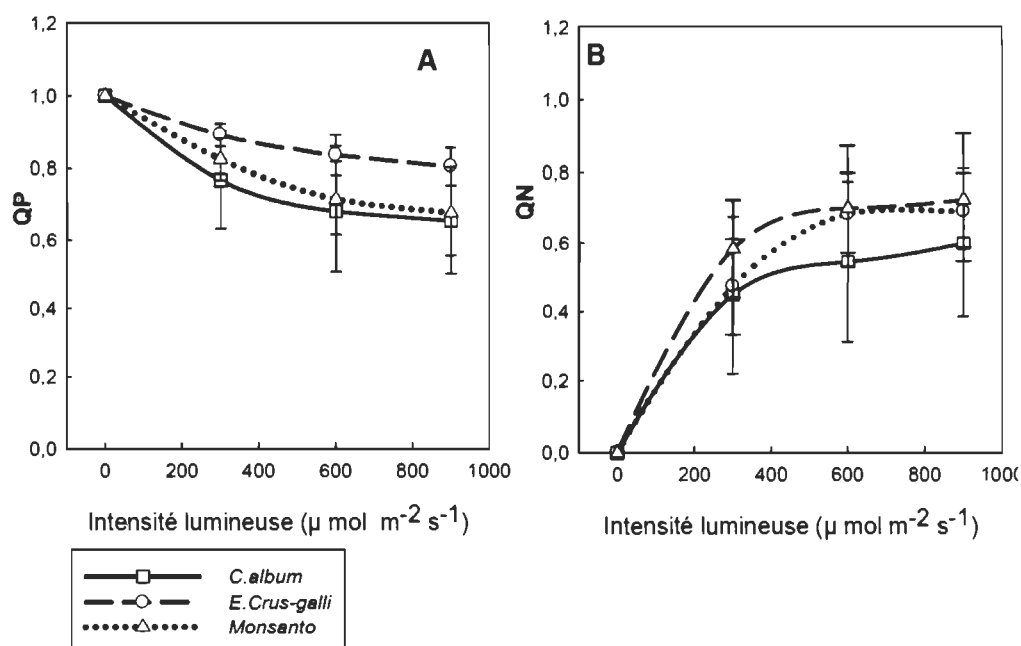
**Figure 4.1** Variations des paramètres de la fluorescence chlorophyllienne  $F'_0$ ,  $F'_M$  et  $F_s$  en fonction de l'intensité de la lumière ambiante chez *Chenopodium album* (CA), *Echinochloa crus-galli* (EC) et le maïs *Monsanto* (M)

#### 4.1.2 Variations de quenching photochimique (QP) et non photochimique (QN) en fonction de l'intensité lumineuse

À partir des niveaux de fluorescence présentés à la partie précédente, nous avons calculé les coefficients de quenching photochimique (QP) et non photochimique (QN) correspondant aux différentes intensités lumineuses chez les trois espèces étudiées.

Pour les trois espèces, la valeur de QP diminue avec l'augmentation de l'intensité lumineuse. À l'obscurité, où l'efficacité photochimique est maximale, QP a une valeur maximale égale à un. Puis, QP diminue avec l'augmentation de l'intensité lumineuse jusqu'à une valeur minimale (Figure 4.2 A) qui varie entre 0,65 et 0,80 selon l'espèce. La valeur la plus importante de QP a été observée chez EC (monocotylédone) tandis que CA (dicotylédone) montre la plus faible.

Chez les trois espèces, QN augmente avec l'augmentation de l'intensité lumineuse. À l'obscurité, où QN a une valeur minimale égale à zéro et, donc, la proportion de l'énergie lumineuse dissipée sous forme de chaleur est minimale. Puis, QN augmente avec l'augmentation de l'intensité lumineuse jusqu'à atteindre une valeur maximale qui varie entre 0,59 et 0,72 selon l'espèce (Figure 4.2 B). La valeur la plus importante de QN a été signalée chez EC (monocotylédone) tandis que la plus faible a été observée chez CA (dicotylédone).



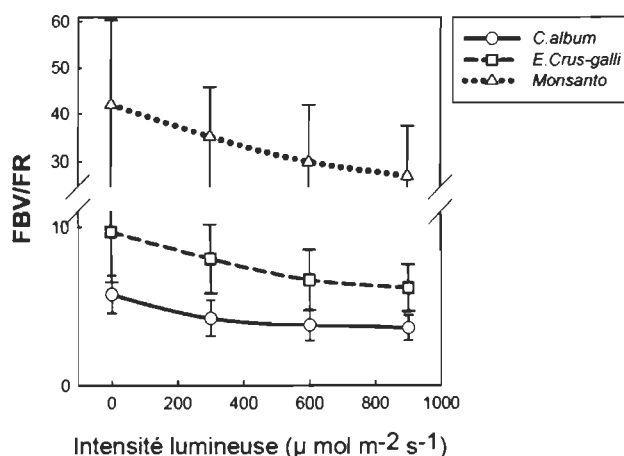
**Figure 4.2** Diminution de QP et augmentation de QN avec l'augmentation de l'intensité lumineuse chez *Chenopodium album* (CA), *Echinochloa crus-galli* (EC) et le maïs *Monsanto* (M)

### 4.1.3 Effet de l'intensité lumineuse sur la forme des spectres de fluorescence

Après avoir caractérisé les effets de différentes intensités lumineuses sur les intensités de la fluorescence chlorophyllienne, nous avons ensuite étudié les effets de l'intensité lumineuse sur les caractéristiques spectrales des fluorescences chlorophyllienne et bleu-vert. Plus spécifiquement, nous avons caractérisé les variations spectrales induites par la lumière ambiante à l'aide de deux paramètres largement utilisés dans la littérature, soit les ratios des intensités FBV/FR et FR/FRL (Giltson *et al.*, 1998; Ounis *et al.*, 2001; Agati *et al.*, 1995; Canaani *et al.*, 1990), où FBV est la fluorescence bleu vert, FR est la fluorescence rouge et FRL est la fluorescence rouge lointain.

#### 4.1.3.1 Effet de l'intensité lumineuse sur le ratio FBV/FR

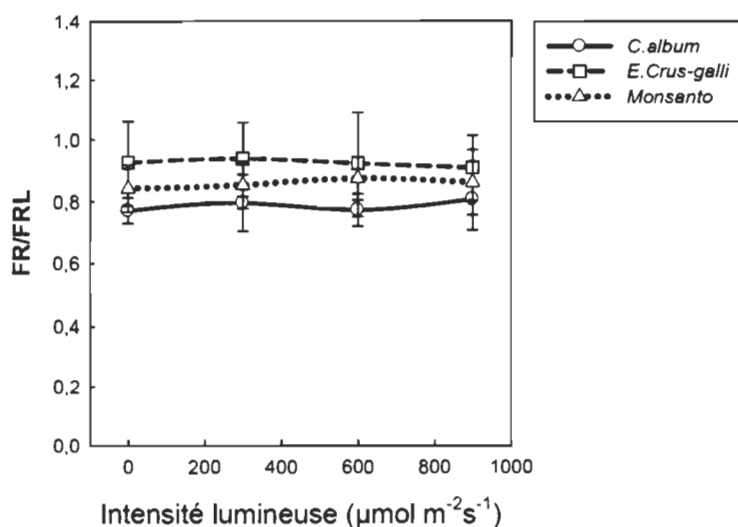
Les valeurs du ratio FBV/FR varient grandement selon les espèces, soit par exemple à l'obscurité 41,98, 9,71 et 5,9 respectivement pour le maïs M, EC et CA. Chez les trois espèces, le ratio FBV/FR diminue avec l'augmentation de l'intensité lumineuse (Figure 4.3). On remarque que les baisses de ratio FBV/FR sont similaires chez M, EC et CA. Ainsi, suite à l'augmentation de l'intensité lumineuse de l'obscurité à  $900 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , le ratio FBV/FR a diminué de 35 %, 34 % et 33 % respectivement chez M, EC et CA.



**Figure 4.3** Diminution de ratio FBV/FR avec l'augmentation de l'intensité lumineuse chez *Chenopodium album* (CA), *Echinochloa crus-galli* (EC) et le maïs Monsanto (M)

#### 4.1.3.2 Effet de l'intensité lumineuse sur le ratio FR/FRL

Les valeurs du ratio des intensités FR/FRL varient légèrement entre les trois espèces étudiées, soit 0,92, 0,84 et 0,77 respectivement pour EC, M et CA à l'obscurité (Figure 4.4). Par contre, chez les trois espèces, l'intensité lumineuse a peu d'effet sur le ratio FR/FRL. Ce dernier garde une valeur relativement constante au cours de l'augmentation de l'intensité lumineuse.



**Figure 4.4** Insensibilité du ratio FR/FRL aux augmentations de l'intensité lumineuse chez *Chenopodium album* (CA), *Echinochloa crus-galli* (EC) et le maïs Monsanto (M)

#### 4.1.4 Discussion

En plus de l'espèce, les caractéristiques spectrales de la fluorescence émise par les végétaux dépendent de plusieurs facteurs dont l'intensité de la lumière ambiante lors des mesures de fluorescence. Puisque l'intensité lumineuse ambiante peut varier largement et rapidement au champ comme par exemple lors du passage des nuages, elle pourrait par conséquent diminuer le potentiel de la signature spectrale de fluorescence à discriminer le maïs des mauvaises herbes aux champs. Ainsi, pour élaborer une stratégie de classification visant à minimiser l'erreur de prédiction, nous avons tout d'abord quantifié les impacts des variations de l'intensité lumineuse ambiante sur les paramètres

de FChl, dont l'émission est fortement dépendante de l'activité photosynthétique, pour ensuite relier ces variations d'intensités de FChl aux modifications des spectres de fluorescence induite par UV.

Nous avons remarqué que les paramètres de la FChl varient avec l'intensité lumineuse et, dans une moindre mesure, avec l'espèce. Chez les feuilles adaptées à l'obscurité, la lumière modulée non-actinique du fluorimètre Xe-PAM induit la FChl d'une intensité minimale qui correspond au niveau  $F_0$ . Dans cet état, tous les centres réactionnels des photosystèmes II (PSII) sont ouverts (i.e. la totalité des accepteurs primaires d'électrons  $Q_A$  sont oxydés), ce qui permet une efficacité photochimique maximale des PSII (Maxwell *et al.*, 2000). Ainsi, l'atténuation de l'énergie d'excitation par la voie photochimique est maximale (QP maximal à 1) et la dissipation régulée de l'énergie sous forme de chaleur est minimale (QN minimal à 0). Sous ces conditions, l'application d'un pulse lumineux saturant va momentanément réduire tous les  $Q_A$  et induire l'intensité maximale de la FChl, correspondant au niveau  $F_M$  (Maxwell *et al.*, 2000).

L'absorption par la feuille d'une lumière ambiante à une intensité actinique (i.e. suffisante pour induire la photosynthèse) modifie la FChl de deux façons. Tout d'abord, le transport photosynthétique d'électrons cause l'acidification du lumen des chloroplastes. Cette acidification active des mécanismes de régulation qui dissipe de façon non-photochimique (i.e. sous forme de chaleur) l'excès de l'énergie absorbée : par conséquent, l'application d'un flash lumineux saturant va induire la FChl à une intensité maximale pour ces conditions ( $F'_M$ ), mais qui est nécessairement plus faible que le niveau  $F_M$  induit par le même flash saturant donné à l'obscurité. Cette atténuation non-photochimique de  $F'_M$  en présence de lumière actinique est quantifiée par le coefficient QN, qui augmente avec l'intensité lumineuse ambiante (Figure 4.2 A). Il est à noter que lorsque QN devient suffisamment important, il peut non seulement diminuer  $F'_M$  mais aussi  $F'_0$  (Figure 4.1 A).

Le deuxième effet de la lumière ambiante sur FChl est l'augmentation du niveau  $F_s$  (induit par la lumière modulée non-actinique du fluorimètre Xe-PAM) (Figure 4.1 C).



Cette augmentation de  $F_s$  est causée par la réduction de  $Q_A$  dans une certaine proportion de la population des PSII, qui sont alors photochimiquement inactifs (« fermés »). Par rapport à  $F_0$ , l'augmentation de  $F_s$  sous une lumière ambiante actinique est relativement faible (35 % chez CA) tandis que celle induite par un flash saturant ( $F_M$ ) est beaucoup plus importante, jusqu'à 600 % (Horton *et al.*, 1996; Maxwell *et al.*, 2000). La fermeture des PSII due à la réduction des  $Q_A$  causant la hausse de  $F_s$  est corrélée à la baisse du quenching photochimique de la FChl, QP (Figure 4.2 A).

Bien que les mêmes variations générales de  $F_s$  et  $F'_M$  (et donc QP et QN) en fonction de l'intensité lumineuse ambiante aient été observées chez les trois espèces étudiées, les amplitudes de ces variations étaient sensiblement différentes. En effet, EC montrait les plus fortes valeurs de QN et de QP (du moins à  $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Donc, la mauvaise herbe monocotylédone EC avait la plus grande capacité à dissiper l'énergie absorbée sous forme de chaleur (fort QN). Ceci permet d'éviter la fermeture des centres réactionnels (PSII) et par conséquent, de maintenir des valeurs de QP plus élevées (et donc plus faible hausse de  $F_s$ ). À l'inverse, la mauvaise herbe dicotylédone CA montrait les valeurs les moins élevées de QP et QN et donc la plus faible capacité de dissipation d'énergie (causant la plus forte hausse de  $F_s$ ). À des intensités lumineuses supérieures à  $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , le maïs M avait des valeurs de QN et de QP similaires à EC.

Les résultats présentés à la figure 4.1 montrent bien que les paramètres  $F_s$  et  $F'_M$  de la FChl varient en fonction de l'intensité lumineuse. Par ailleurs, il a été démontré que la FBV est indépendante de l'activité photosynthétique (Stober *et al.*, 1993) et reste constante malgré les variations à court terme de l'intensité de la lumière ambiante (donc insensible aux phénomènes de quenching QP et QN) (Bongi *et al.*, 1991). Par conséquent, les variations de la FChl en fonction de l'intensité lumineuse ambiante (hausse de  $F_s$  et baisse de  $F'_M$ ) peuvent affecter le spectre d'émission de la fluorescence induite par UV de deux façons, soit par des augmentations ou des diminutions du ratio FBV/FR selon que les flashes d'excitation UV soient respectivement actiniques (induction de  $\approx F'_M$ ) ou non-actiniques (induction de  $\approx F_s$ ). Les résultats de la figure 4.3 montrent bien chez les trois espèces étudiées que le ratio FBV/FR diminue d'environ  $34 \pm 1\%$  lorsque l'intensité lumineuse augmente de 0 à

900  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Cela signifie que les intensités de FR déterminées avec le spectrofluorimètre correspondent au niveau Fs mesuré avec le Xe-PAM. Donc, les flashes d'excitation UV du spectrofluorimètre produits par notre lampe au xénon sont non-actiniques et ne modifient pas à eux seuls le spectre d'émission de la fluorescence. Ceci est consistant avec le fait que les spectres d'émission de fluorescence demeurent constants malgré l'augmentation du nombre de flashes d'excitation UV (voir section 3.3).

Cependant, il est important de noter que même la plus forte hausse de Fs observée chez CA est insuffisante pour expliquer entièrement la baisse du ratio FBV/FR. En effet, la hausse de Fs de 33 % chez cette espèce diminuerait le ratio FBV/FR de 5.90 à 4.34 tandis que la valeur de ce ratio mesurée à 900  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  est environ 3.75. Ceci est encore plus marqué pour les deux autres espèces M et E. La baisse de FVB/FR non-attribuable à la hausse de Fs pourrait fort possiblement être causée par une augmentation de la température des feuilles lorsque l'intensité de la lumière augmentait (i.e. lorsque les feuilles se rapprochaient des lampes de serre métal halide). En effet, il est connu que lorsque la température des feuilles augmente de 1°C, l'intensité de la FBV émise par celles-ci diminue de 1 à 5 % (Bongi *et al.*, 1994; Morales *et al.*, 1998). Ce phénomène pourrait devenir significatif en plein champ et ainsi s'ajouter aux sources de variations diminuant le potentiel de la fluorescence à discriminer le maïs des mauvaises herbes présentes dans les champs.

Contrairement au ratio FBV/FR, le ratio FR/FRL mesuré sous nos conditions est plutôt insensible aux variations de l'intensité lumineuse, donc aux variations de quenching QP et QN (Figure 4.4). Nos observations contrastent avec celles d'Agati *et al.* (1995) qui avaient observé une baisse du ratio FR/FRL de 0,98 à l'aube jusqu'à 0,65 le midi en plein soleil chez le noyer *Juglans regia*. Cette baisse est expliquée par le fort quenching de la fluorescence du PSII qui contribue davantage à FR qu'à FRL. Cette baisse du ratio FR/FRL implique que l'excitation laser utilisée par le fluorimètre LEAF® (Laser Excited Automatic Fluorometer) d'Agati *et al.* (1995) était actinique et donc que les intensités du niveau FR mesurées correspondaient davantage à F'M qu'à Fs, contrairement à notre spectrofluorimètre. Dans notre cas, l'utilisation d'une excitation

non-actinique diminue les variations d'intensité de la FChl et donc les modifications des spectres d'émission de la fluorescence des végétaux. Ceci est un net avantage pour la discrimination de différentes espèces végétales par la fluorescence.

#### **4.1.5 Conclusion**

Cette première partie de travail a démontré que, sous nos conditions expérimentales, les variations de l'intensité lumineuse modifiaient significativement les spectres d'émission de la fluorescence des végétaux, diminuant le ratio FBV/FR mais non pas le ratio FR/FRL. Ces observations impliquent que l'intensité de FChl induite par notre spectrofluorimètre correspond au niveau Fs et donc que l'excitation UV produite par notre lampe au xénon est non-actinique. Même si une telle excitation minimise les modifications des spectres d'émission de fluorescence induite par la lumière ambiante, il reste à déterminer dans quelle mesure ces modifications spectrales influenceront le potentiel de la fluorescence à discriminer les maïs des mauvaises herbes sous différentes intensités de lumière ambiante. C'est le sujet de la prochaine partie du travail.

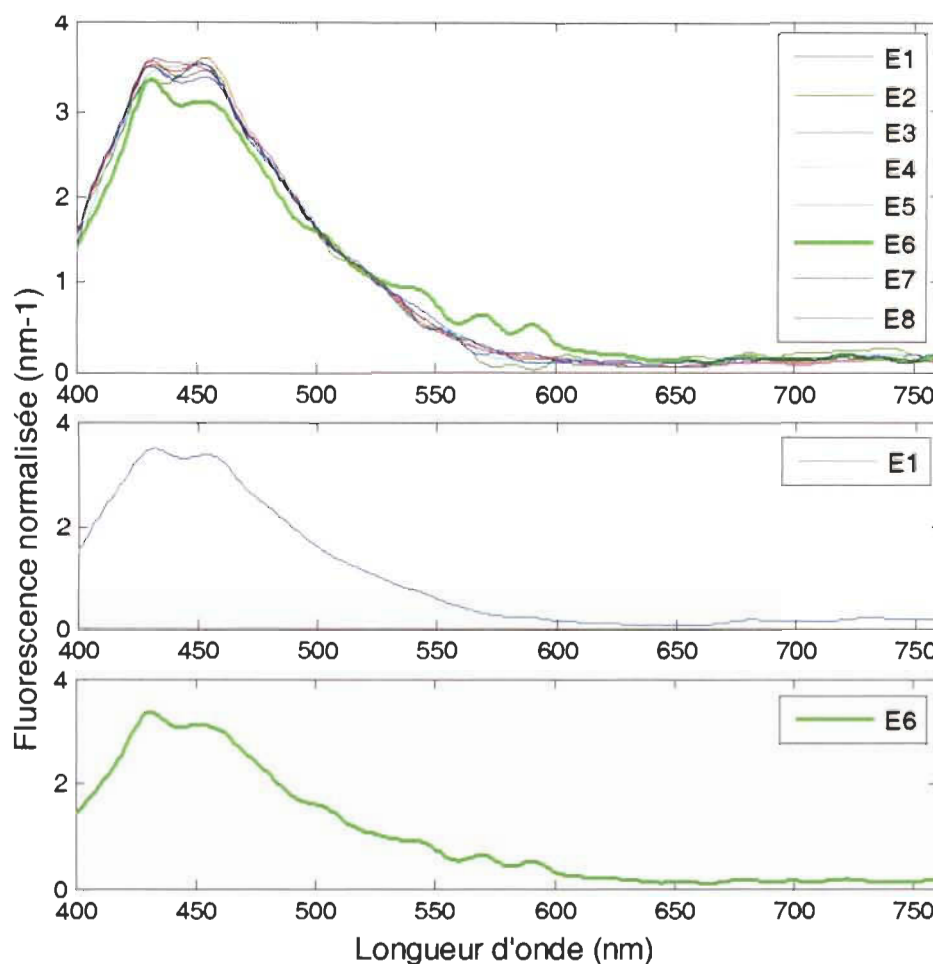
### **4.2 Discrimination entre le maïs et les mauvaises herbes**

Dans cette partie de travail, nous avons déterminé l'efficacité de la signature spectrale de fluorescence à discriminer les groupes de plante (maïs et mauvaises herbes monocotylédones et dicotylédones) cultivées à l'extérieur et soumises à différentes intensités de lumière ambiante (de 0 à 900  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) durant les mesures de fluorescence.

#### **4.2.1 Tri des données à visuelle et basé sur l'analyse en composantes principales**

Les données des trois campagnes de mesure ont été visualisées à l'aide des scripts sous Matlab<sup>TM</sup>. Les spectres pour une même espèce ou un même hybride, sous les mêmes conditions de mesure, ont été regroupés dans un graphique. Ceux dont la forme était visiblement différente de la forme de la majorité des spectres ont été éliminés. Par exemple, pour le maïs Elite (E), sous intensité I2, il y avait

huit échantillons avant le tri visuel. Le spectre E6 était anormal (Figure 4.5) à cause des épaulements entre 540 et 600 nm qui ne sont pas visibles pour les autres échantillons. Cet échantillon a été éliminé pour le reste de l'analyse.



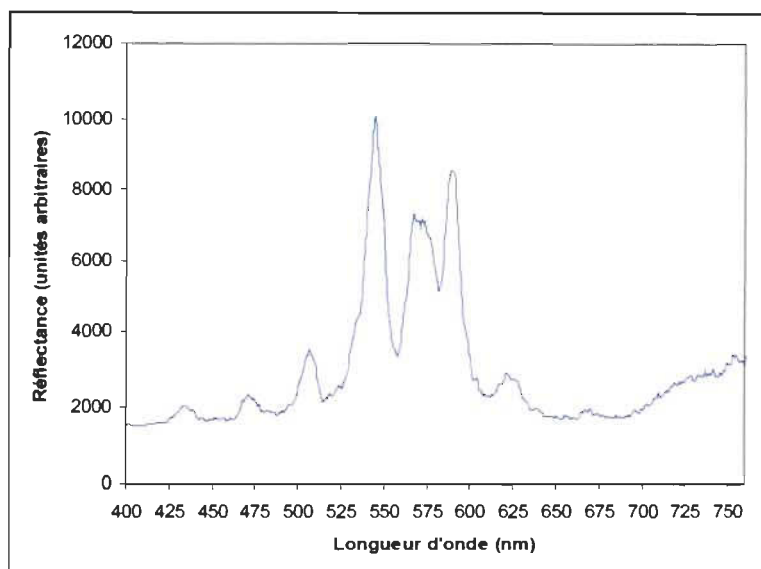
**Figure 4.5** Spectres normalisés pour le maïs Elite (E) sous I2 avant tri (E1 spectre normal, E6 spectre anormal)

Le deuxième tri est basé sur l'analyse en composantes principales. Les données résultantes du premier tri ont été utilisées pour construire des modèles en composantes principales. Un modèle a été construit pour chaque espèce ou hybride et une intensité lumineuse. Les vecteurs propres pour les composantes principales ont été visualisés. Par comparaison visuelle entre le spectre de la lampe et le spectre des vecteurs propres pour les premières composantes, la composante principale qui semblait contenir le plus

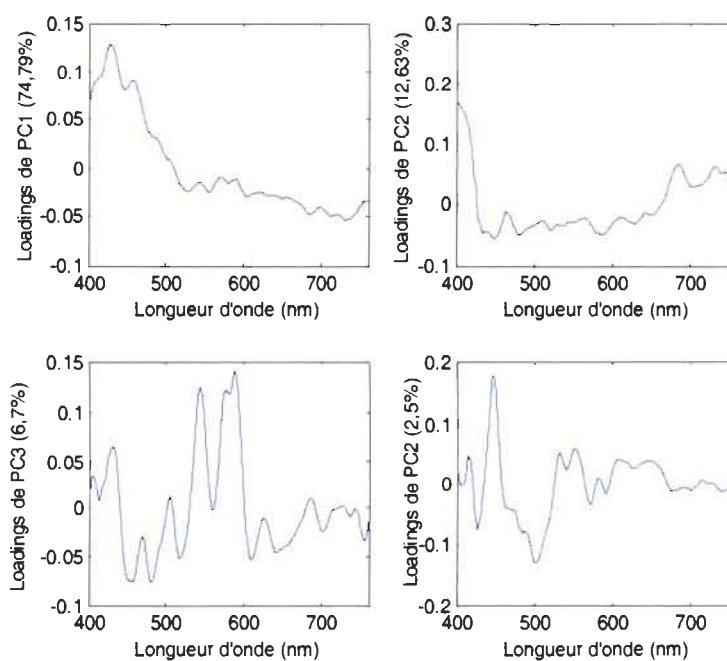
d'information au sujet de la lampe était identifiée. Cela se justifie à cause de la technique de mesure de la fluorescence qui procédait par différence entre, un spectre contenant de la lumière réfléchie et des photons émis par fluorescence et, un spectre de réflectance. Ces deux spectres étaient pris en séquence pendant que l'opérateur tenait la tête de lecture à la main avec comme conséquence que la géométrie n'était pas parfaite. Ainsi, on obtenait la situation suivante :

$$\tilde{S}_F = (S_F + S_R) - \alpha S_R = S_F + S_R(1 - \alpha)$$

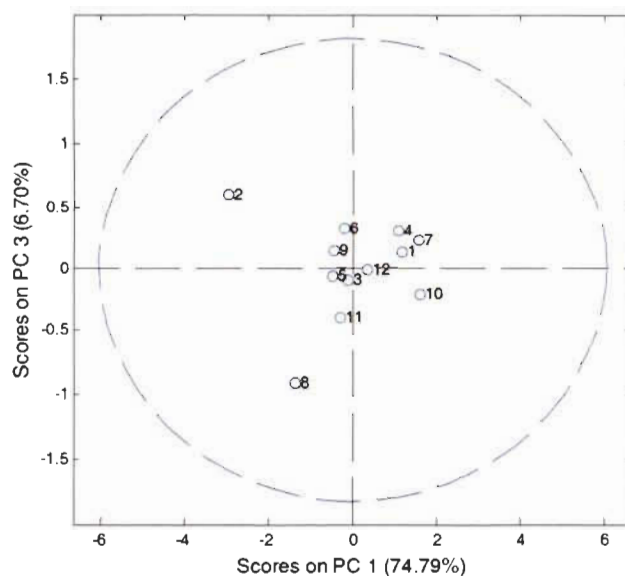
où  $\tilde{S}_F$  est le spectre de fluorescence estimé;  $S_F$ , le spectre de fluorescence;  $S_R$ , le spectre de réflectance et  $\alpha$  un gain représentant l'effet du changement de géométrie entre le moment où  $(S_F + S_R)$  était mesuré et celui où  $S_R$  était mesuré. Lorsque le gain était égal à 1, la géométrie était stable et le spectre de fluorescence estimé égalait le spectre de fluorescence. Autrement ( $\alpha \neq 1$ ), le spectre de fluorescence estimé était contaminé par une fraction du spectre de réflectance. Or, cette contamination s'ajoute à la variance totale pour un groupe de spectres et la décomposition en composantes principales devrait l'isoler si le niveau de contamination est significatif. Le spectre de la lampe tel que vu par le spectrographe montre 3 pics caractéristiques vers 540, 570 et 585 nm dans une région où l'intensité des spectres de fluorescence est relativement faible (Figure 4.6). Sur la figure 4.7, on retrouve la signature de la lampe dans le vecteur propre de la troisième composante principale et on note que sur cette composante principale, les échantillons 2 et 8 sont les plus éloignés du centre (Figure 4.8). L'échantillon 8 a une valeur négative sur le troisième axe principal, ce qui correspond à  $\alpha > 1$  et donc à une empreinte négative du spectre de la lampe sur le spectre de fluorescence (Figure 4.9). La situation était inversée pour l'échantillon 2 mais l'effet était moins perceptible. Dans cet exemple, les échantillons 2 et 8 ont été exclus de la base de données. Cette technique a été appliquée systématiquement pour tous les groupes de plantes (par espèce/hybride et intensité lumineuse) pour détecter les échantillons anormaux qui avaient échappé au premier tri.



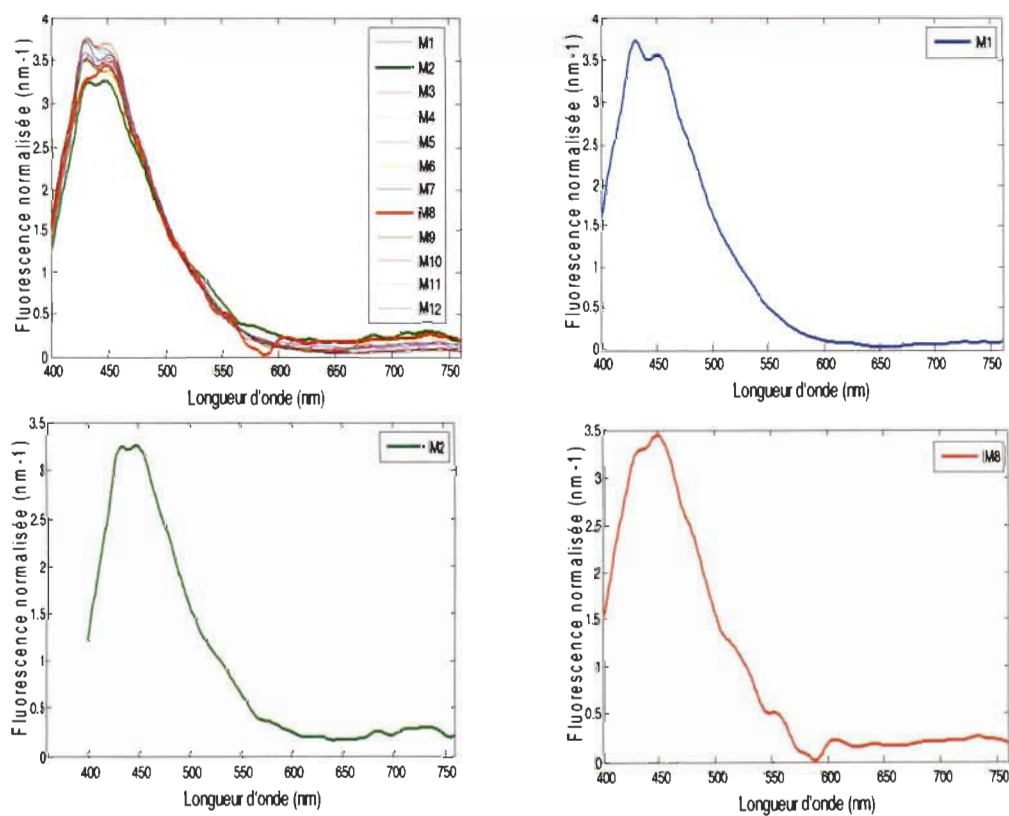
**Figure 4.6** Spectre d'émission des lampes Oriels mesuré par le spectrographe



**Figure 4.7** Loadings pour Monsanto sous I1 avant tri des données



**Figure 4.8** Composantes des échantillons sur le premier et le troisième axe du modèle ACP construit sur le maïs *Monsanto* sous I1 avant tri des données



**Figure 4.9** Spectres normalisés pour Monsanto sous I1 avant tri



Une fois le tri complété, il restait 140 spectres pour l'étude de l'effet de l'intensité lumineuse sur la fluorescence mesurée sur un potentiel de 144 (3 campagnes, 3 espèces, 4 pots, 4 intensités lumineuses) et 275 spectres pour la discrimination entre les mauvaises herbes et le maïs sur un potentiel de 528 (3 campagnes, 11 espèces, 4 pots pour chaque espèce, 4 intensités lumineuses). Toutes les analyses, figures et tableaux des sections 4.3 et 4.4 sont basés sur les données triées. Le nombre de spectres par espèce/hybride et par intensité lumineuse apparaît au tableau 4.1.

**Tableau 4.1**

Nombre d'échantillons par espèce et par intensité lumineuse après tri des spectres

Espèce/Groupe	Intensité lumineuse				
	I0	I1	I2	I3	I0-I3
<b>E</b>	5	5	4	4	18
<b>M</b>	11	7	3	6	27
<b>P</b>	5	7	3	5	20
<b>S</b>	10	8	6	6	30
<b>Maïs</b>	<b>31</b>	<b>27</b>	<b>16</b>	<b>21</b>	<b>95</b>
<b>DI</b>	10	6	5	7	28
<b>EC</b>	8	6	3	5	22
<b>PC</b>	7	7	6	4	24
<b>SG</b>	8	8	5	5	26
<b>Mono</b>	<b>33</b>	<b>27</b>	<b>19</b>	<b>21</b>	<b>100</b>
<b>AR</b>	10	8	3	6	27
<b>CA</b>	10	8	6	6	30
<b>CB</b>	10	5	5	3	23
<b>Dico</b>	<b>30</b>	<b>21</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>80</b>

#### 4.2.2 Classification à partir des données acquises à $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Dans cette partie, nous étudions les caractéristiques discriminantes de la fluorescence en examinant en détail les spectres, les composantes principales et les vecteurs propres définissant les axes principaux en nous limitant aux données mesurées

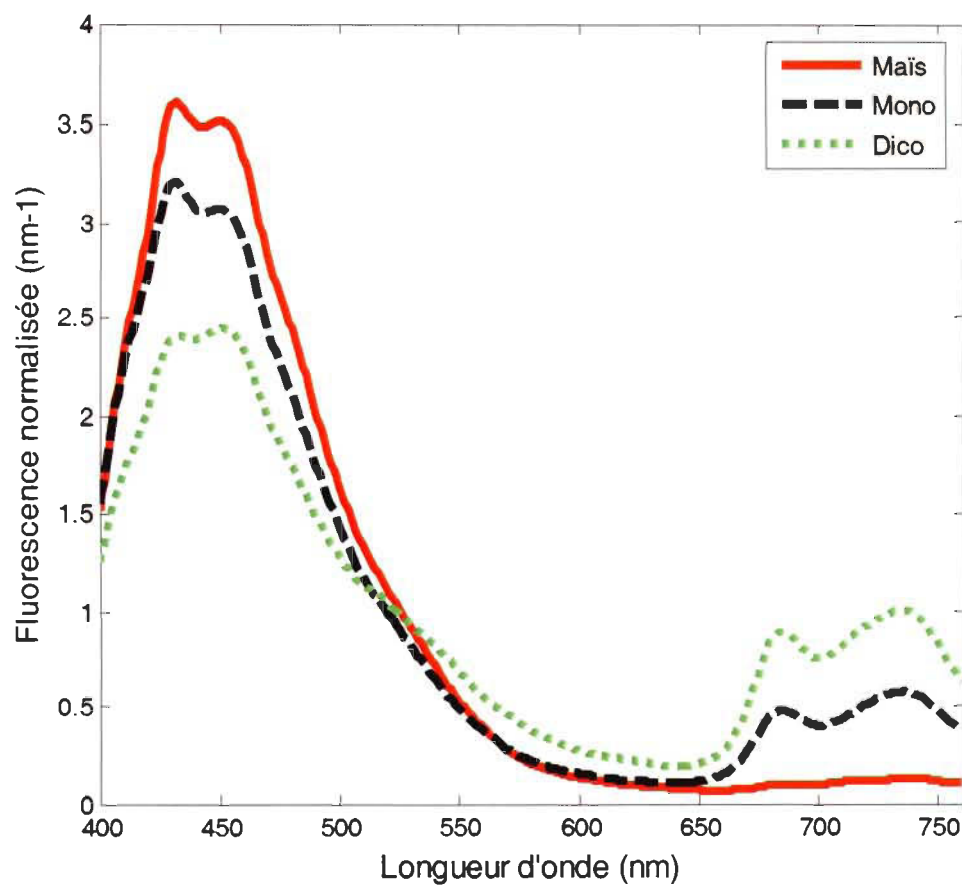


à  $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Le graphique des spectres moyens pour les trois groupes de plantes (maïs, mauvaises herbes monocotylédones et mauvaises herbes dicotylédones) montre bien les différences dans les spectres de fluorescence (Figure 4.10). Le maïs et les mauvaises herbes monocotylédones ont une FBV plus élevée que les dicotylédones comme déjà observé par Chappelle *et al.* (1985). L'épaulement à 530 nm est plus prononcé chez les dicotylédones que chez les deux autres groupes, ce qui est en accord avec d'autres résultats déjà publiés (Lichtenthaler *et al.*, 1992; Stober *et al.*, 1994; Lichtenthaler et Miehe, 1997). Autour de la bande de fluorescence de longueur d'onde entre 575 et 660 nm, les trois groupes ont un niveau de fluorescence similaire. Pour ce qui est du reste du spectre, les mauvaises herbes dicotylédones ont le signal le plus élevé, suivies par les mauvaises herbes monocotylédones et finalement le maïs dont le signal est presque nul. Nos résultats sont conformes à ceux de Longchamps *et al.* (2006) et de Chappelle *et al.* (1985).

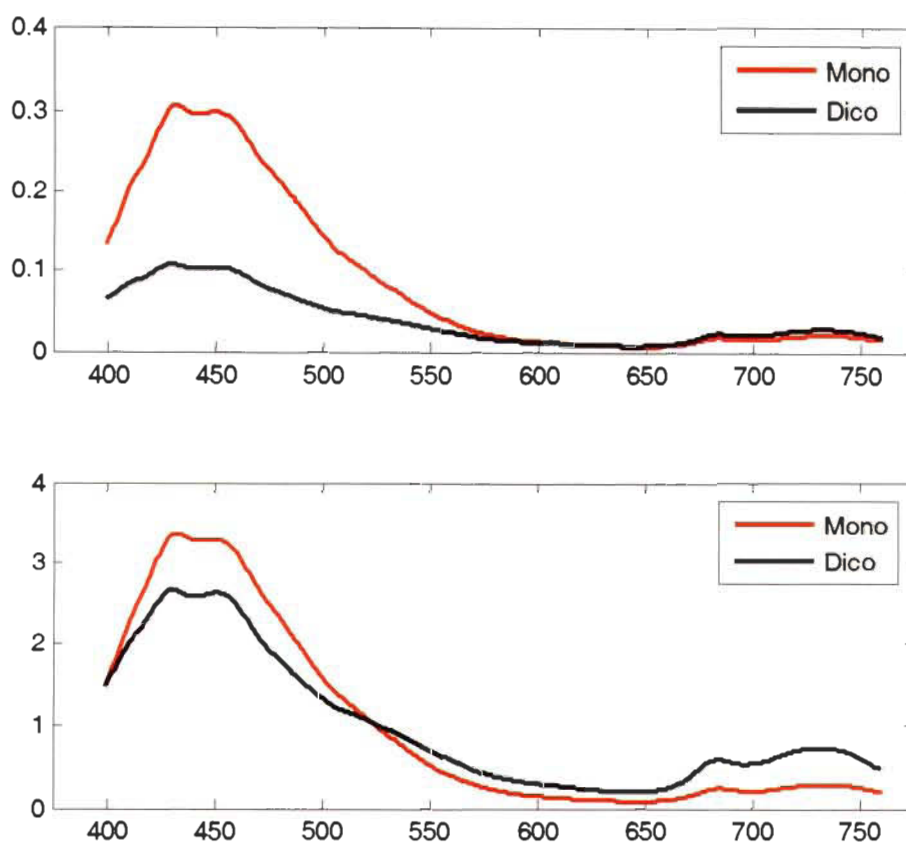
En cherchant à expliquer les différences observées, nous avons tenu compte du fait que le processus de normalisation des spectres transfère de l'information entre la FBV et la FChl. Ce processus est montré à la figure 4.11. Avant normalisation, la FChl pour la monocotylédone est à peu près de même intensité que pour la dicotylédone. Par contre, après normalisation, la dicotylédone montre une plus forte FChl et la différence dans la FBV qui existait avant normalisation s'estompe. Dans ce cas, la plus faible intensité de la fluorescence moyenne pour la dicotylédone fait en sorte que la normalisation amplifie tout son spectre. On voit donc clairement que le processus de normalisation doit nous amener à nous concentrer sur la forme des spectres car l'information sur l'intensité moyenne est disparue.

Pour la FBV, les observations faites plus haut sur les spectres moyens peuvent s'expliquer par la différence dans la composition de fluorophores qui émettent dans cette bande de longueur d'onde. Les graminées (dont le maïs) possèdent une plus forte concentration d'acide férulique et par conséquent une plus grande intensité de FBV par rapport aux plantes dicotylédones (Cerovic *et al.*, 1999). Ils ont également plus de composés phénoliques non fluorescents tels que les acides hydroxycinamiques et des flavonoïdes. En bloquant la pénétration des UV, ces composés fluorescents et non

fluorescents limitent l'excitation des parties internes de la feuille d'où origine la FChl. En conséquence, il y a plus de FChl émise par les dicotylédones telles que nos observations le confirment.

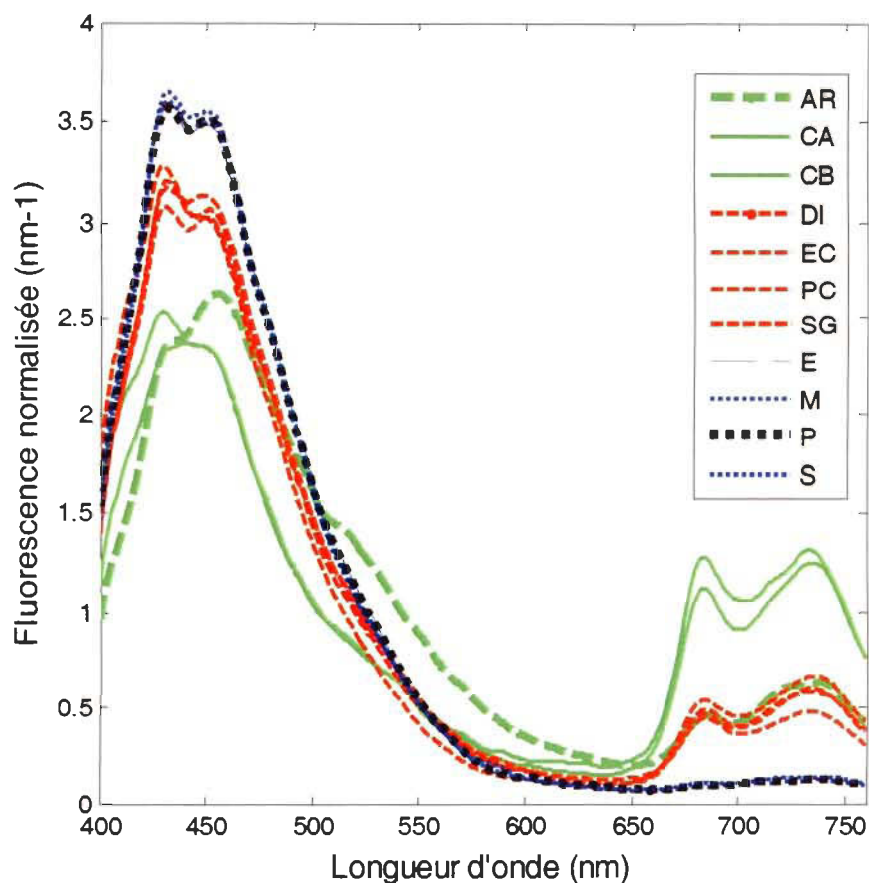


**Figure 4.10** Moyenne par groupe de plantes des spectres acquis à  $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$



**Figure 4.11** Comparaison des spectres moyens avant (haut) et après normalisation (bas). L'abscisse donne les longueurs d'onde en nm et l'ordonnée l'intensité de la fluorescence en unités quelconques.

L'observation des spectres moyens des différentes plantes permet facilement de distinguer entre les groupes. La figure 4.12 montre que les hybrides de maïs forment un groupe homogène sur l'ensemble du spectre. Les mauvaises herbes dicotylédones forment le groupe le plus hétérogène pour la FBV autant autour du pic principal qu'au niveau de l'épaulement. L'homogénéité du groupe des mauvaises herbes monocotylédones est proche de celle des hybrides de maïs. L'observation des spectres moyens a donc montré qu'il existe un bon potentiel pour la discrimination entre le maïs, les mauvaises herbes monocotylédones et les mauvaises herbes dicotylédones.



**Figure 4.12** Moyenne par espèces/hybrides des spectres acquis à  $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .  
Bleu : maïs; rouge : mauvaises herbes monocotylédones; vert : mauvaises herbes dicotylédones

Pour étudier le potentiel discriminant de la fluorescence, un modèle SIMCA comprenant 11 classes (sous-modèles) a été développé pour classer les plantes par espèce ou hybride. Le nombre de composantes principales (CP) pour chaque sous-modèle a été fixé en regardant la courbe de variance cumulative capturée. On s'arrête au nombre de composantes principales par lesquelles la pente de courbe devient faible et où les composantes principales expliquent un faible pourcentage de la variance totale intra-classe. Le nombre de composantes principales varie d'un sous-modèle à l'autre (Tableau 4.2).

**Tableau 4.2**

Nombre de composantes principales pour les différents sous-modèles lors de la classification par espèce/hybride

<b>Espèce /Hybride</b>	<b>E</b>	<b>M</b>	<b>P</b>	<b>S</b>	<b>DI</b>	<b>EC</b>	<b>PC</b>	<b>SG</b>	<b>AR</b>	<b>CA</b>	<b>CB</b>
<b>Nombre de CP</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>3</b>

L'erreur de prédiction pour la classification par espèce/hybride était de 67 %. La matrice de confusion montre que le pourcentage le plus élevé d'erreur (52 % de l'erreur de prédiction) provient de la confusion des hybrides de maïs qui sont classés comme des mauvaises herbes monocotylédones (SG). La deuxième source d'erreur est la confusion intraclasse (maïs, mauvaises herbes monocotylédones, mauvaises herbes dicotylédones) (44 %) (Tableau 4.3). La dernière source d'erreur de prédiction est la confusion entre les mauvaises herbes monocotylédones (DI, EC), qui sont classées comme AR (4 %). Dans aucun cas, il n'y avait une confusion entre le maïs et les mauvaises herbes dicotylédones.

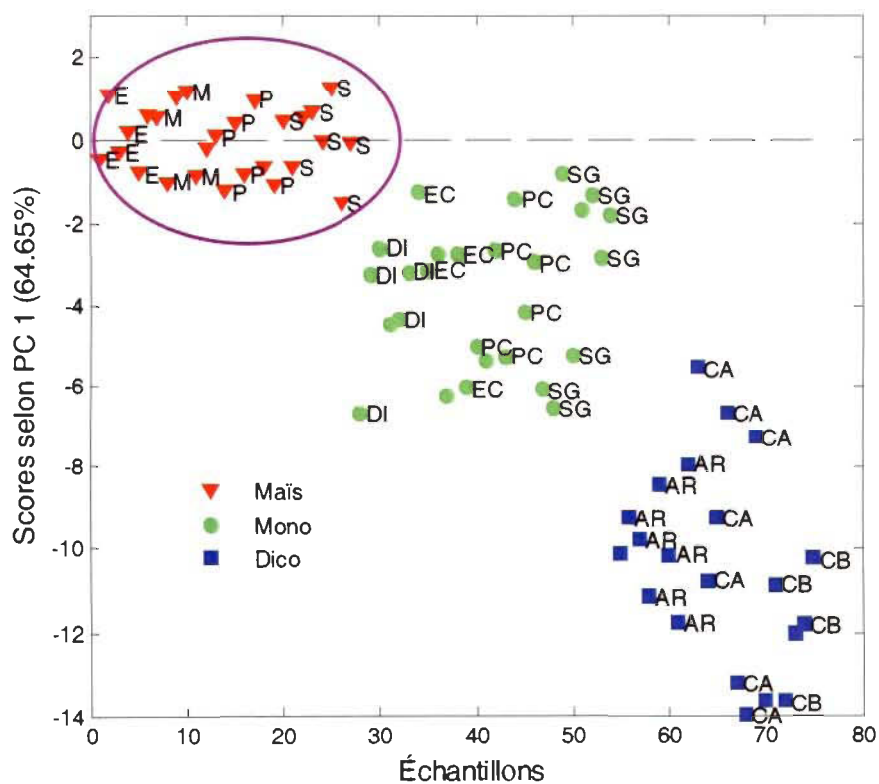
**Tableau 4.3**

Matrice de confusion des plantes classées par espèce/hybride. Les sous-matrices de confusion intraclasse sont en couleur. Rouge : maïs (E, M, P et S); vert : mauvaises herbes monocotylédones (DI, EC, PC et SG); bleu : mauvaises herbes dicotylédones (AR, CA et CB)

Réels	Prédites										
	E	M	P	S	DI	EC	PC	SG	AR	CA	CB
E	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0
M	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0
P	0	0	0	1	0	0	0	7	0	0	0
S	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0
DI	0	0	0	0	3	0	0	2	1	0	0
EC	0	0	0	0	0	0	0	5	1	0	0
PC	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0
SG	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0
AR	0	0	0	0	0	0	0	0	7	1	0
CA	0	0	0	0	0	0	0	0	1	7	0
CB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0

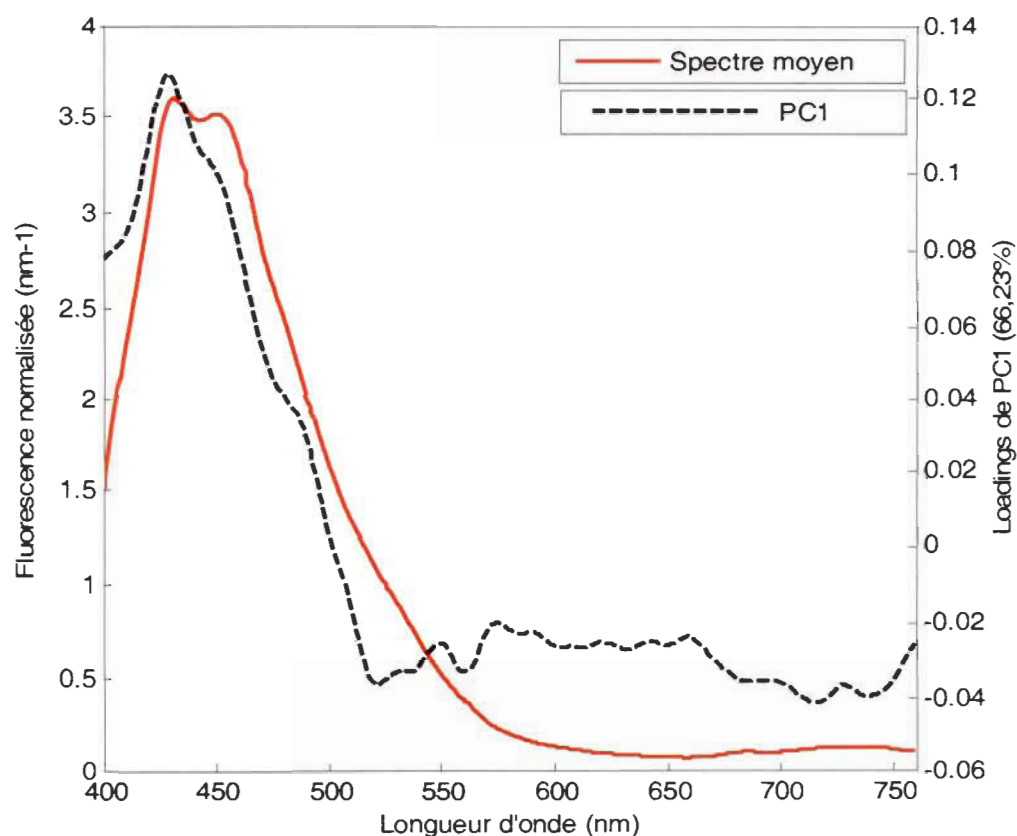
Un modèle SIMCA a été construit en regroupant les espèces/hybrides en trois groupes (maïs, mauvaises herbes monocotylédones et mauvaises herbes dicotylédones). Le modèle SIMCA le plus performant en validation croisée a 1, 1 et 2 composantes principales pour les classes maïs, mauvaises herbes monocotylédones et mauvaises herbes dicotylédones respectivement.

Pour le maïs, l'unique composante principale retenue explique 64,65 % de la variance intraclasse. Cette composante principale permet une bonne séparation entre le maïs et les mauvaises herbes sans confusion avec les dicotylédones, mais avec confusion avec les monocotylédones (Figure 4.13). Le vecteur propre de la première composante principale a des valeurs positives entre 400-500 nm (Figure 4.14). Ainsi, les échantillons ayant une fluorescence normalisée plus forte que les autres dans la bande 400-500 nm ont une valeur plus élevée sur le premier axe de l'ACP. À partir de 500 nm jusqu'à 760 nm, le vecteur propre a des valeurs négatives. Ainsi, plus la FChl normalisée est forte, plus la valeur de la composante est faible. L'ACP pour le maïs utilise donc principalement la différence entre la FBV et la FChl comme caractéristique de la première composante. Les hybrides du groupe maïs ont la plus forte FBV associée à la plus faible FChl et l'ACP utilise cette caractéristique comme signature unique du maïs, ce qui permet une bonne discrimination.



**Figure 4.13** Composantes des échantillons sur le premier axe du modèle ACP construit sur le maïs

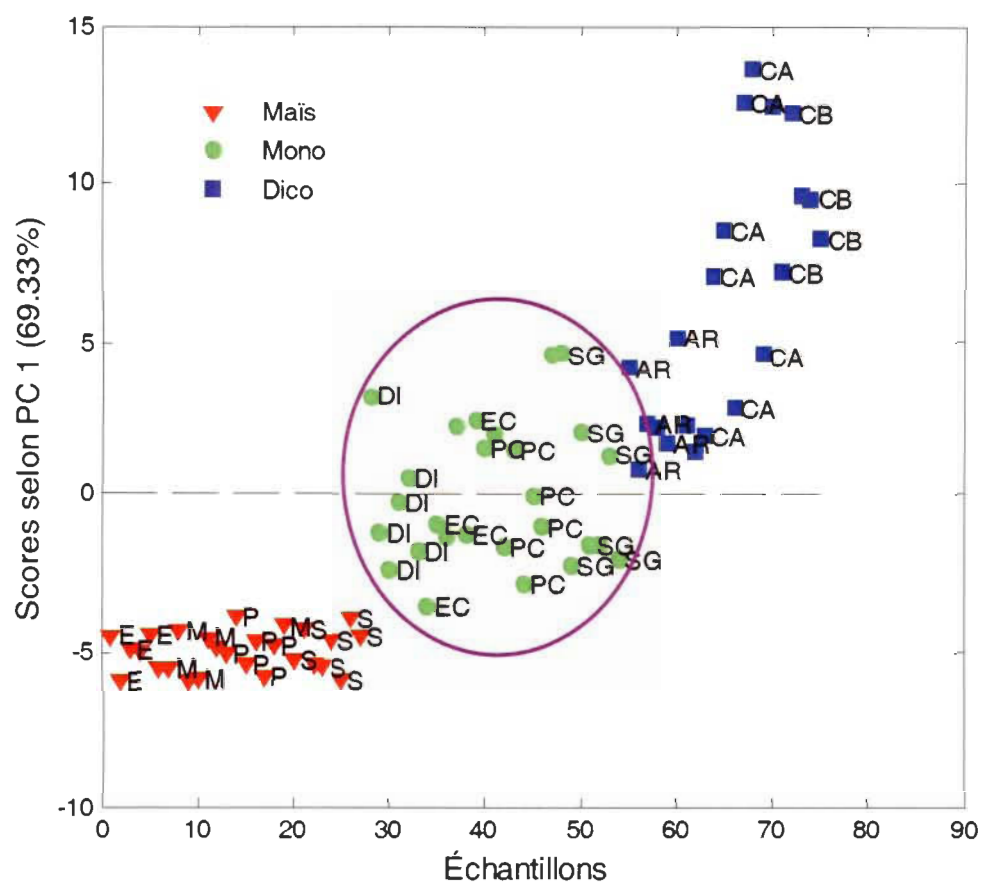




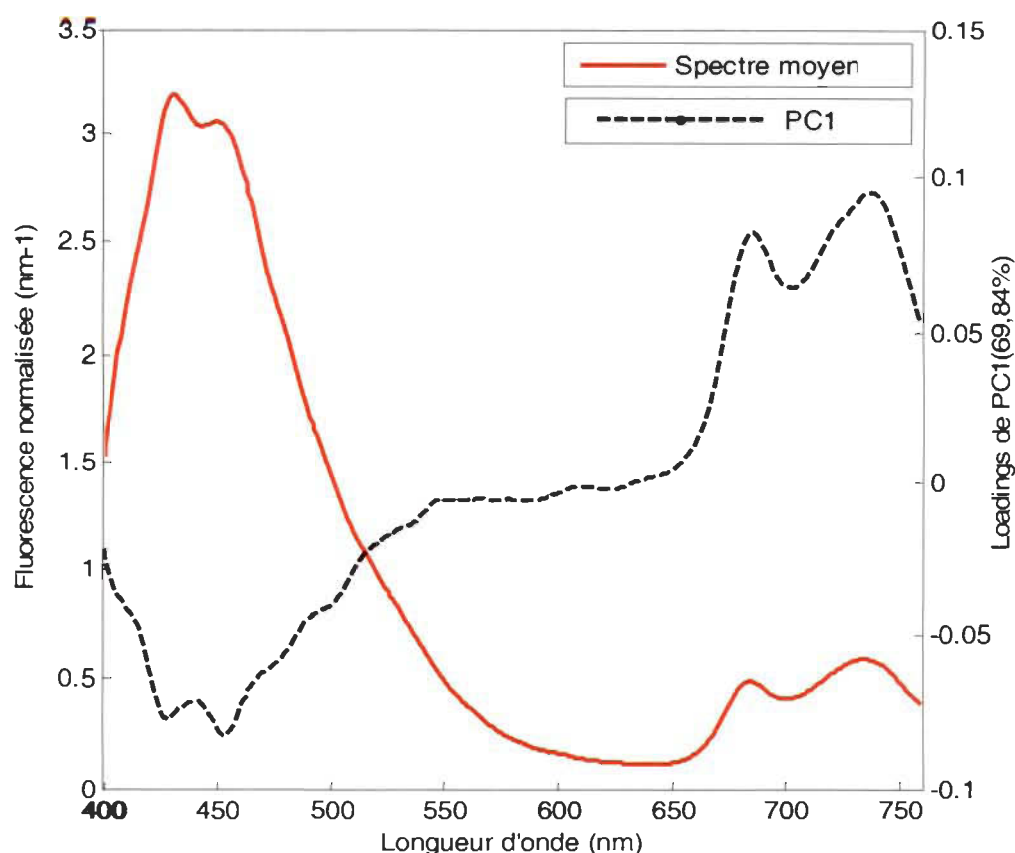
**Figure 4.14** Vecteur propre de la première composante principale pour le sous-modèle du maïs et spectre moyen associé

Pour les mauvaises herbes monocotylédones, le modèle construit a une seule composante principale qui explique 69,33 % de la variance de ce groupe. Le modèle permet de bien séparer les monocotylédones du maïs (Figure 4.15). Par contre, il existe une confusion relativement importante entre les mauvaises herbes monocotylédones et dicotylédones. Le vecteur propre montre que la FBV et la FChI sont opposées (Figure 4.16). Donc, une FBV faible et une FChI forte sont associées à une valeur élevée de la composante. L'absence relative de FChI pour le maïs donne des valeurs plus négatives qui permettent de bien séparer le maïs des monocotylédones. Parmi les dicotylédones, AR a une FChI plus faible qui est comparable à celle des mauvaises herbes monocotylédones. On voit ainsi une confusion entre AR et les monocotylédones.





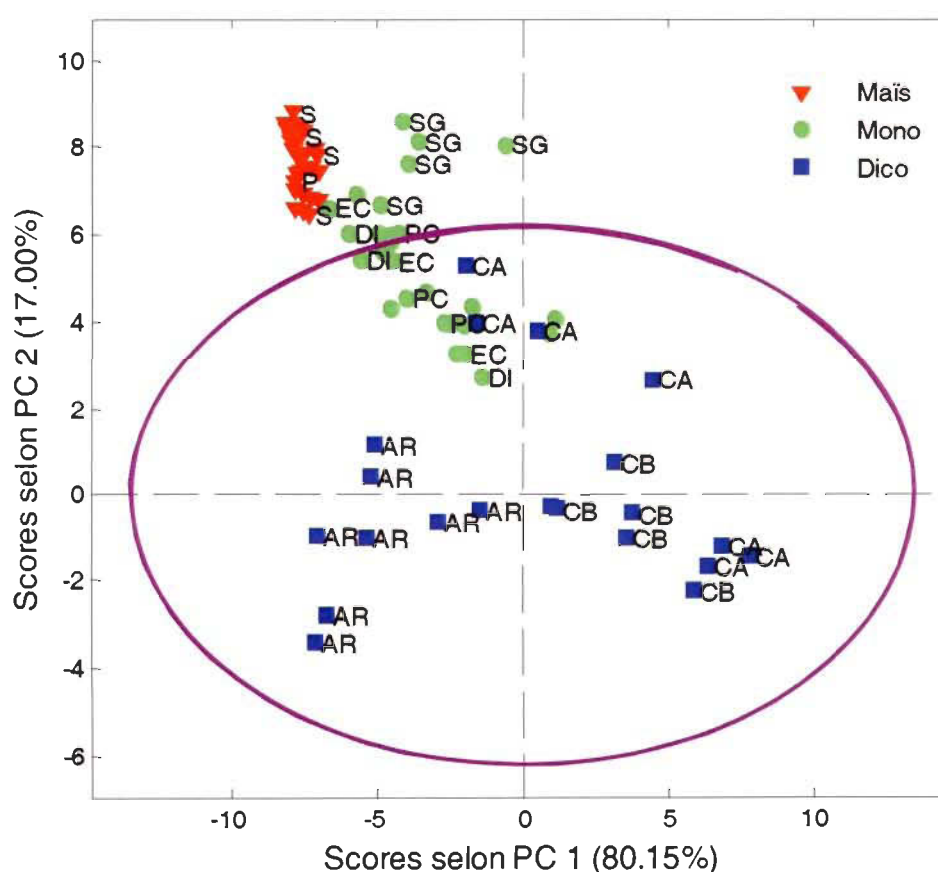
**Figure 4.15** Composantes des échantillons sur le premier axe du modèle ACP construit sur les mauvaises herbes monocotylédones



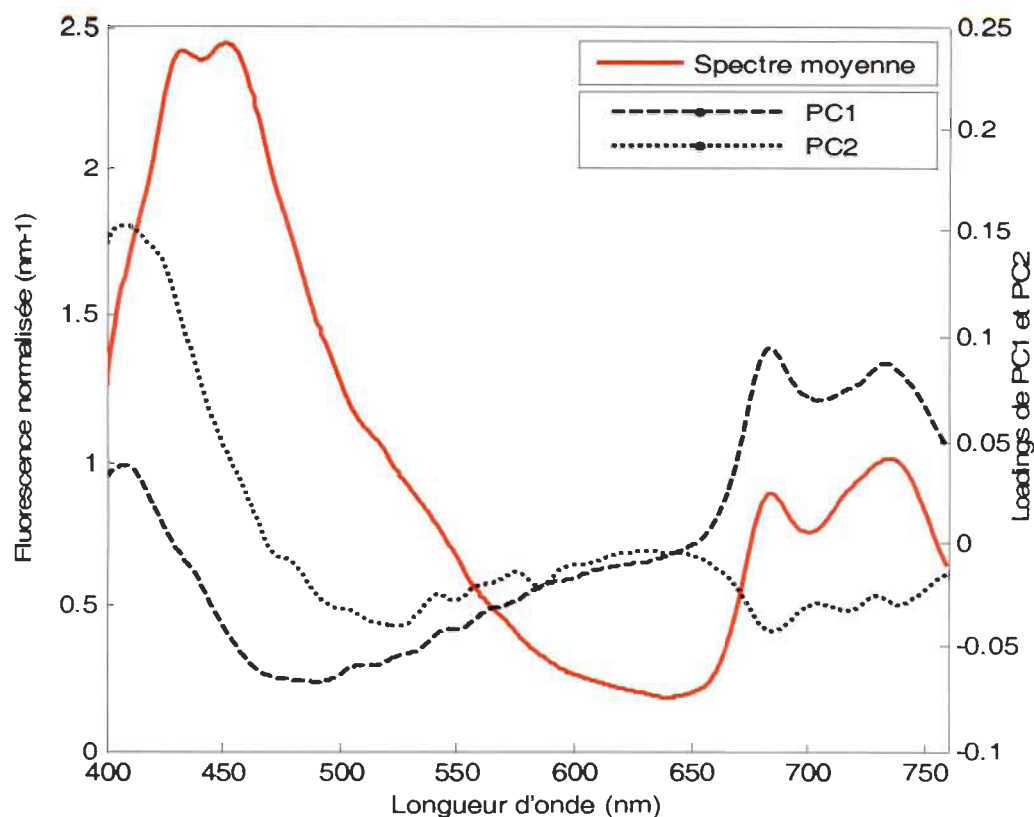
**Figure 4.16** Vecteur propre de la première composante principale pour le sous-modèle des mauvaises herbes monocotylédones et spectre moyen associé

Le modèle construit pour les mauvaises herbes dicotylédones a deux composantes principales. La première composante (PC1) explique 80,15 % de la variance intra-classe et la deuxième (PC2) en explique 17 %. Le modèle construit a permis de séparer la plupart des dicotylédones des deux autres groupes (Figure 4.17). L'axe PC 1 n'est pas vraiment discriminant sauf pour les dicotylédones dont la valeur sur cet axe est positive. Pour la première composante (PC1), le vecteur propre a des valeurs positives pour des longueurs d'onde supérieures à environ 650 nm et négatives aux autres longueurs d'onde excepté entre 400 et 430 nm où les valeurs sont positives (Figure 4.18). Cette composante principale cherche donc à isoler les individus où la FChl est relativement plus importante par rapport à la FBV de la même manière que PC1 pour l'ACP sur les monocotylédones. Le deuxième axe (PC2) a un bon pouvoir

discriminant. Le vecteur propre pour la deuxième composante est négatif pour des longueurs d'ondes supérieures à environ 470 nm et positif entre 400 et 470 nm. Le pic de FBV est bimodal avec un mode vers 430 nm et un autre vers 460 nm (Figure 4.16). En moyenne, le mode à 460 nm est supérieur à celui à 430 nm pour les dicotylédones alors que l'inverse se produit pour le maïs et les mauvaises herbes monocotylédones. C'est cette caractéristique qu'isole la deuxième composante principale. Pour la dicotylédone CA, c'est plutôt le mode à 430 nm qui est supérieur d'où une certaine confusion entre CA et les monocotylédones.



**Figure 4.17** Composantes des échantillons sur les deux premiers axes du modèle ACP construit sur les mauvaises herbes dicotylédones



**Figure 4.18** Vecteurs propres des deux premières composantes principales pour le sous-modèle des mauvaises herbes dicotylédones et spectre moyen associé

Le modèle SIMCA a été construit à partir des trois sous-modèles discutés plus haut. L'erreur en validation croisée du modèle est de 5 %. La majeure partie de l'erreur (75 %) provient de la confusion entre le maïs et les mauvaises herbes monocotylédones (Tableau 4.4). Cependant, Il n'y a aucune confusion entre le maïs et les dicotylédones. En deuxième position vient, la confusion entre les mauvaises herbes monocotylédones et les dicotylédones (25 %). À  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , le modèle SIMCA construit permet une discrimination performante avec peu de composantes principales, ce qui devrait conférer de la robustesse au modèle.

**Tableau 4.4**

Matrice de confusion obtenue par le modèle SIMCA où on utilise la totalité de spectre.  
Erreur de prédiction : 5 %

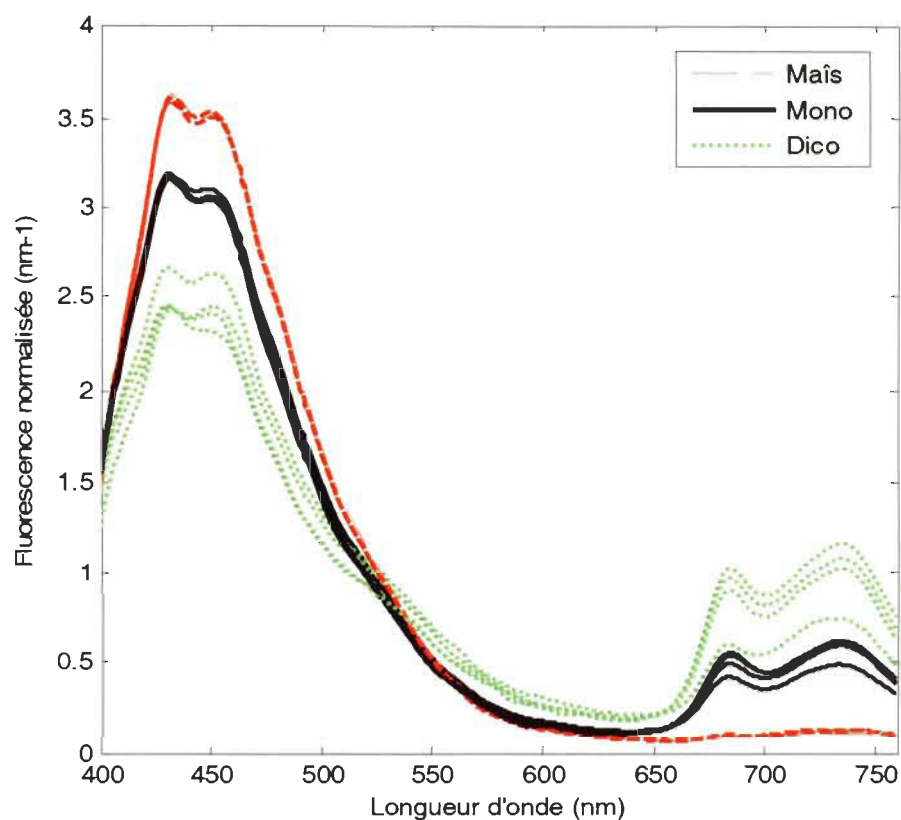
Réelles	Prédites		
	Maïs	Mono	Dico
<b>Maïs</b>	24 (88,89 %)	<b>3</b> (11,11 %)	0
<b>Mono</b>	0	26 (96,30 %)	<b>1</b> (3,70 %)
<b>Dico</b>	0	0	21 (100 %)

#### 4.2.3. Effet de l'intensité lumineuse sur la classification

Les spectres moyens des trois groupes de plantes varient avec l'intensité lumineuse (Figure 4.19). Malgré cette variation, les spectres d'un même groupe de plantes forment un ensemble assez homogène pour que la différence entre les groupes soit visible. Par contre, la distinction dans la portion FChl est moins nette. L'homogénéité du groupe des hybrides de maïs et du groupe des mauvaises herbes monocotylédones est supérieure à celle du groupe des dicotylédones.

Pour étudier l'effet de l'intensité lumineuse sur le potentiel de la fluorescence induite par UV pour la discrimination entre les trois groupes de plantes, le pourcentage de réussite de classification à différentes intensités lumineuses a été calculé. À chaque intensité lumineuse, un modèle SIMCA a été construit en suivant un cheminement semblable à celui décrit à la section précédente. L'effet de l'intensité lumineuse est évalué en comparant les erreurs de classification en validation croisée pour les différentes intensités lumineuses. On a aussi appliqué le modèle étalonné à chaque intensité lumineuse pour prédire les classes pour les données obtenues aux autres intensités lumineuses. Cela permet de vérifier la robustesse des modèles par rapport à l'intensité lumineuse. Si cette variable n'a pas d'effet significatif, on s'attend à ce qu'un modèle développé à partir de données à une intensité lumineuse donne de bons résultats en classification lorsqu'on l'applique à un jeu de données obtenu sous une intensité

lumineuse différente. Le nombre de composantes principales retenu pour chaque sous-modèle en composantes principales est présenté au tableau 4.5.



**Figure 4.19** Variation des spectres moyens de trois groupes de plantes en fonction de l'intensité lumineuse. Les courbes d'une même couleur correspondent aux différentes intensités lumineuses.

**Tableau 4.5**

Nombre de composantes principales retenues pour le modèle SIMCA construit à différentes intensités lumineuses. Trois classes : maïs, mauvaises herbes monocotylédones et mauvaises herbes dicotylédones (eg. 2-3-2 : 2 CPs pour le maïs, 3 pour les monocotylédones et 2 pour les dicotylédones)

Intensité lumineuse	I0	I1	I2	I3
Nombre de composantes principales	1-2-2	1-1-2	2-2-2	1-3-4

En validation croisée, le pourcentage des échantillons bien classés varie entre 95 % et 99 % selon l'intensité lumineuse (Tableau 4.6). Cette variation est faible, ce qui indique que des modèles SIMCA donnent de bons résultats en validation croisée, donc à intensité lumineuse fixe. En appliquant un modèle étalonné à une intensité lumineuse pour la classification à partir des spectres acquis aux autres intensités lumineuses, les performances ont tendance à se dégrader de façon plus ou moins importante. Par contre, le modèle étalonné à I3 maintient sa capacité de classification à toutes les autres intensités lumineuses. Pour le modèle étalonné à I0, le pourcentage de bien classé décroît avec l'augmentation de l'intensité lumineuse. Le modèle étalonné à I1 s'applique bien à I0 et I2 mais moins bien à I3. Finalement, le modèle étalonné à I2 perd une partie de sa capacité à bien classer à toutes les autres intensités. Pour chacune des valeurs du tableau 4.6, des matrices de confusion ont été calculées (données non montrées). Dans tous les cas où le taux de bien classé baissait sous 90 %, la presque totalité de la confusion venait de monocotylédones qui étaient confondues avec le maïs. Cette confusion touchait environ 25 % à 30 % des monocotylédones.

**Tableau 4.6**

Pourcentage de bien classés en validation croisée (diagonale) et en prédiction (hors diagonale). Dans le tableau, la valeur de 96 % à la ligne I1 et à la colonne I2 signifie que 96 % des échantillons mesurés sous une intensité I2 ont été bien classés par un modèle SIMCA étalonné avec des données obtenues sur I1.

		Jeu de données de test			
		I0	I1	I2	I3
Jeu de données d'étalonnage	I0	99 %	92 %	89 %	82 %
	I1	95 %	95 %	96 %	84 %
	I2	92 %	93 %	100 %	89 %
	I3	97 %	95 %	94 %	95 %

Afin de mieux comprendre la source de la confusion impliquant les monocotylédones, des graphiques montrant les vecteurs propres des modèles ont été préparés (Figure 4.20). Pour chaque groupe de plantes, on a calculé autant de composantes principales que le nombre maximal utilisé dans les sous-modèles SIMCA (Tableau 4.4). Pour chaque groupe de plantes, les vecteurs propres semblent contenir de plus en plus de bruit à mesure que l'intensité lumineuse augmente. Ce bruit apparent est plus prononcé dans la bande entre 525 et 600 nm, là où l'intensité des lampes produisant l'éclairage ambiant est la plus forte (Figure 4.6). À partir de cette observation, on a formulé l'hypothèse que la perte de performance, lorsqu'un modèle développé à une intensité était appliqué à une autre intensité, pouvait être causée par du bruit de mesure venant d'un effet résiduel des lampes.

Cette hypothèse est en partie supportée par le fait que l'erreur de classification n'augmentait pas lorsque les modèles développés à I1 et I3 étaient appliqués à des données acquises à une intensité lumineuse plus faible. Pour le modèle étalonné à I2, la perte de performance est plus grande quand il est appliqué à I3 comparé à I0 ou I1. Autrement dit, quand les modèles sont développés en présence de bruit, ils demeurent performants quand ils sont appliqués à des données contenant moins de bruit. Afin de limiter l'effet du bruit, les analyses ont été répétées en appliquant un filtre plus agressif aux données normalisées (Savgol sur une bande de 101 canaux (95 nm) avec une fonction du 3e degré). L'application de ce filtre change peu les performances (Tableau 4.7) et lorsque le pourcentage de bien classé est sous 90 %, la confusion est encore due à des mauvaises herbes monocotylédones qui sont classées comme du maïs.



**Tableau 4.7**

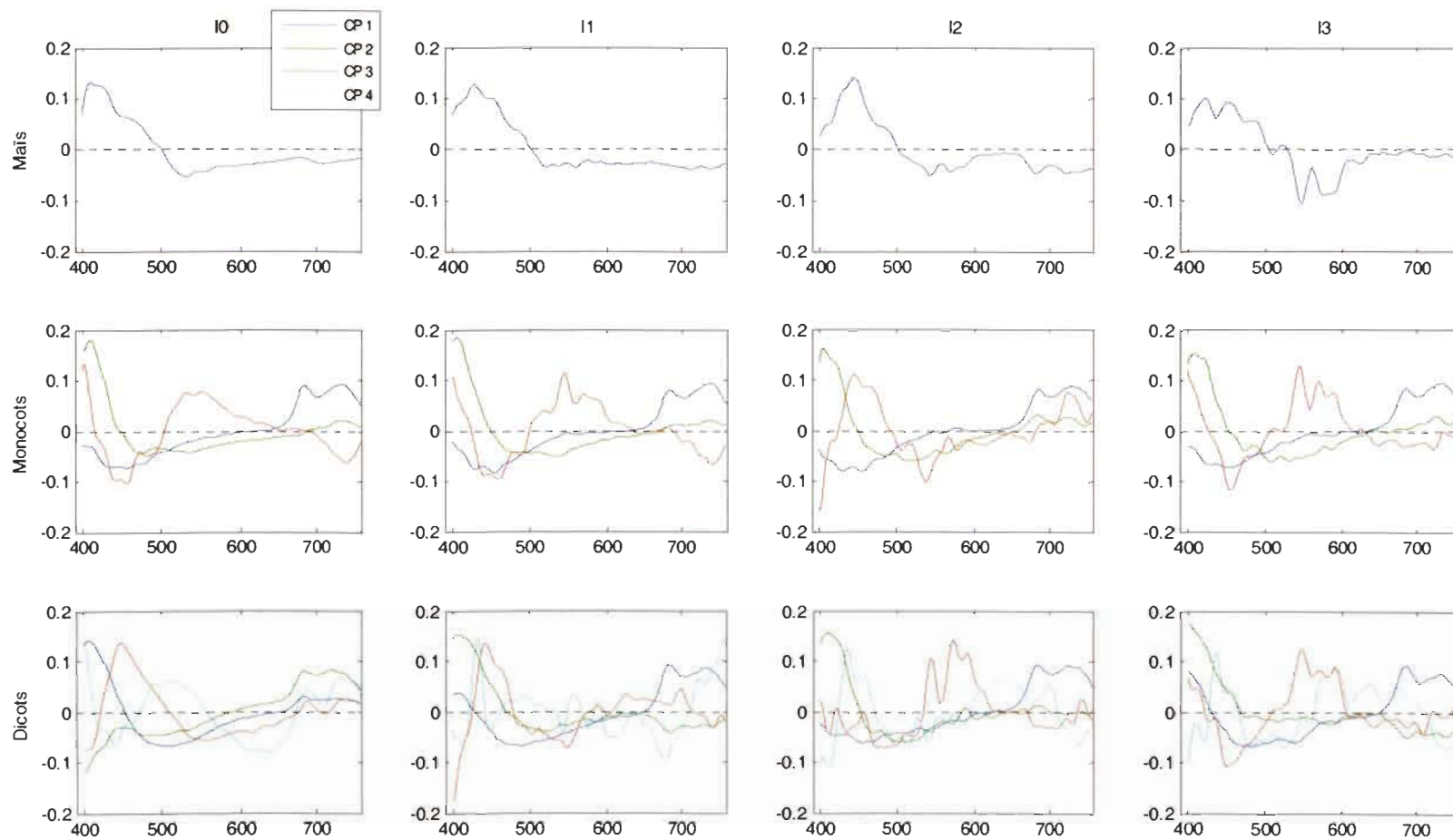
Pourcentage de bien classés en validation croisée (diagonale) et en prédiction (hors diagonale). Filtre sur 95 nm

		Jeu de données de test			
		I0	I1	I2	I3
Jeu de données d'étalonnage	I0	99 %	91 %	91 %	86 %
	I1	93 %	95 %	94 %	86 %
	I2	90 %	93 %	100 %	89 %
	I3	97 %	96 %	96 %	95 %

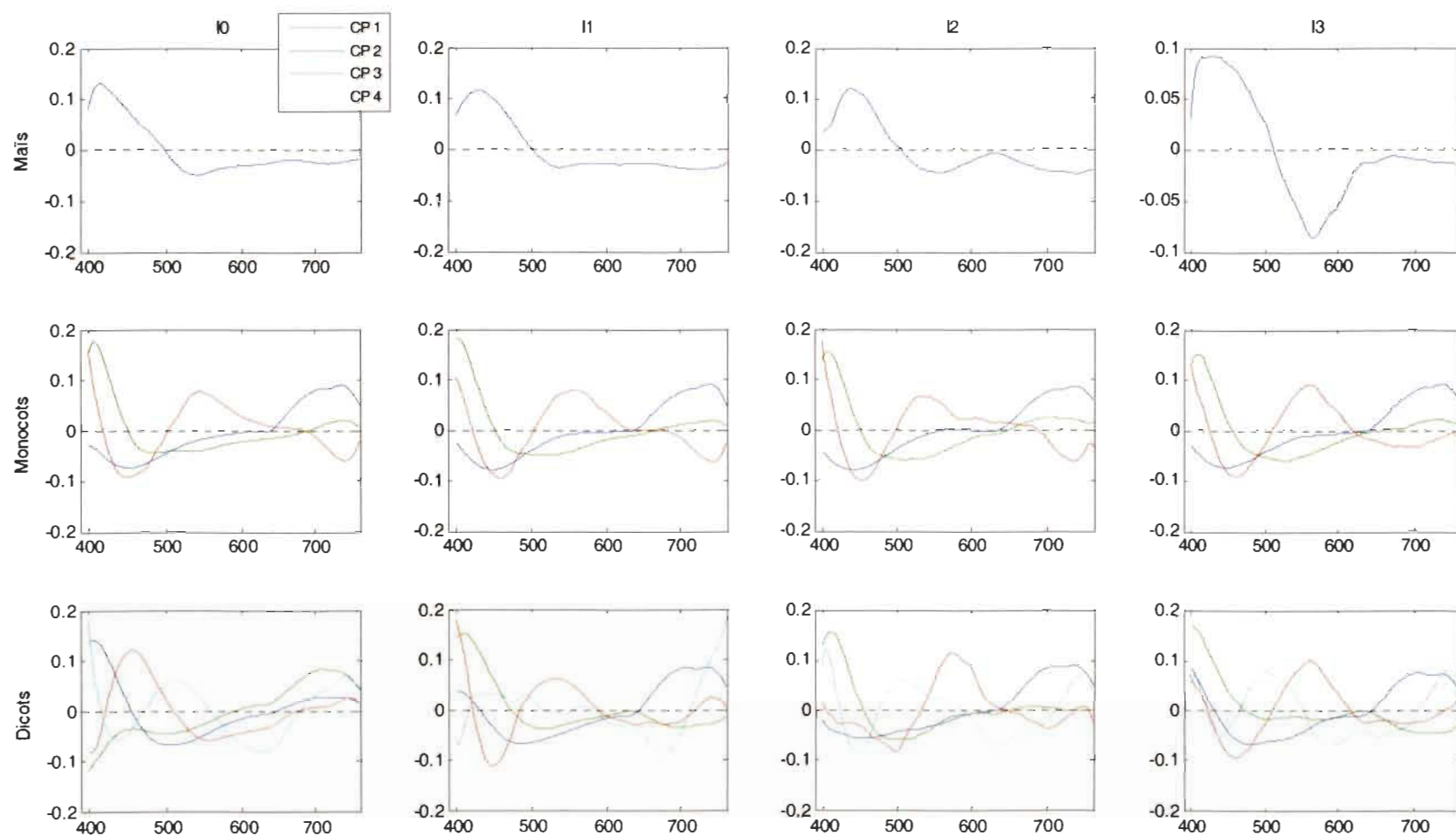
Les vecteurs propres obtenus à partir des données filtrées de façon plus prononcée permettent de suivre plus facilement l'évolution des sous-modèles en fonction de l'intensité lumineuse (Figure 4.21). Pour les monocotylédones, les vecteurs propres changent peu d'une intensité lumineuse à l'autre. Pour le maïs, il se développe un creux dans la région entre 500 et 600 nm à partir de I2. Pour les dicotylédones, la situation est plus complexe. Malgré cela, les performances de classification des dicotylédones restent toujours bonnes que ce soit en validation croisée ou en prédiction. L'examen détaillé des sous-modèles pour le SIMCA étalonné avec les données à I3 montre que le sous-modèle du maïs a une composante produit de la confusion entre les maïs et les monocotylédones. Par contre, le sous-modèle des monocotylédones sépare presque parfaitement le maïs des monocotylédones autant en validation croisée qu'en l'appliquant aux données acquises aux autres intensités lumineuses (I0 à I2). Comme le sous-modèle pour les monocotylédones change peu avec l'intensité lumineuse, c'est l'ajustement du sous-modèle du maïs obtenu à I3 qui explique les bonnes performances et la robustesse du modèle SIMCA correspondant.

L'analyse du paragraphe précédent permet de conclure que l'intensité lumineuse affecte les signatures spectrales. Par contre, des mesures effectuées sous la plus haute intensité lumineuse ont permis d'étalonner un modèle performant et robuste permettant

d'obtenir plus de 95 % de bien classé à toutes les intensités. L'explication la plus plausible est liée au bruit de mesure associé au signal résiduel des lampes dans le spectre de fluorescence. Quand l'intensité est plus grande, ce bruit résiduel est en moyenne, plus grand. L'analyse en composante principale réussit alors mieux à isoler ce bruit du signal de fluorescence dans des composantes qui ne sont pas retenues pour les modèles. Les modèles acquièrent ainsi plus de robustesse. L'utilisation d'un filtre Savgol plus agressif afin de réduire le bruit n'a pas permis d'améliorer significativement les performances, ce qui contredit l'idée que le bruit intervient de façon significative. Par contre, le filtre ne peut pas enlever tout le bruit de mesure, en particulier quand ce bruit s'étend sur une plage spectrale d'une largeur proche de celle du filtre (95 nm), ce qui est le cas du bruit résiduel des lampes qui survient dans la plage entre 525 et 600 nm (bande de 75 nm de large). Si on retient cette explication, il faut donc conclure que l'intensité lumineuse ambiante n'affecte pas le potentiel discriminant de la fluorescence induite par UV.



**Figure 4.20** Vecteurs propres des sous-modèles pour des modèles SIMCA étalonnés aux 4 intensités lumineuses. Filtre standard sur les données

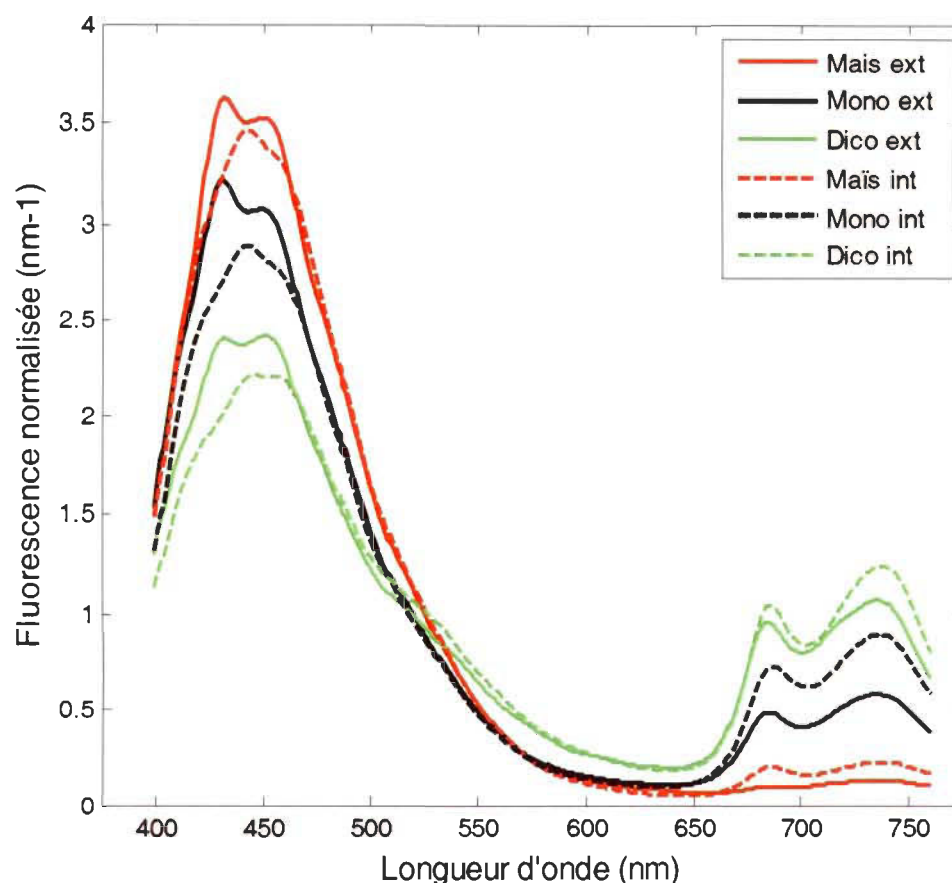


**Figure 4.21** Vecteurs propres des sous-modèles pour des modèles SIMCA étalonnés aux 4 intensités lumineuses. Filtre sur 95 nm appliqué aux données

#### 4.2.4 Comparaison des résultats de classification – plantes cultivées à l'extérieur et mesures de fluorescence sous lampe versus plantes cultivées en cabinet de croissance et mesures en serre

Dans cette partie de travail, nos résultats sont comparés à ceux de Longchamps *et al.* (2006) qui a utilisé les mêmes espèces de mauvaises herbes et hybrides de maïs. Dans Longchamps *et al.* (2006), les plantes ont été cultivées en condition contrôlées en cabinet de croissance. Le jeu de données présenté ici a été obtenu sur des plantes qui ont poussé à l'extérieur. Il est donc intéressant de comparer les résultats obtenus avec ces 2 jeux de données pour voir si les conditions de croissance ont un impact sur le potentiel discriminant. En moyenne, les données de Longchamps ont été obtenues sous une intensité lumineuse de  $440 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Pour obtenir une base de comparaison raisonnable, on a groupé nos données à 300 et  $600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  pour effectuer la comparaison.

En comparant les spectres de nos plantes avec ceux de Longchamps *et al.* (2006), nous avons remarqué que les mauvaises herbes cultivées à l'extérieur ont une FBV plus élevée que celle pour les mêmes espèces qui ont poussé en cabinet de croissance. Pour le maïs, il y a peu de différence de FBV. Par contre, les plantes cultivées sous conditions contrôlées ont une FChl plus élevée (Figure 4.22). Ces différences peuvent être expliquées par l'accumulation, chez les plantes cultivées à l'extérieur, des composés phénoliques non fluorescents dont les flavonoïdes et les acides hydroxycinamiques pour se protéger contre les dommages qui peuvent être induits par les rayons UV (Meyer *et al.*, 2003). Les composés accumulés absorbent les radiations UV, mais ils n'émettent pas de fluorescence (Burchard *et al.*, 2000). Par conséquent, les composés accumulés influencent la signature spectrale en agissant sur la transmittance UV de l'épiderme. Ainsi, les composés phénoliques fluorescents et non fluorescents accumulés dans l'épiderme forment une barrière qui absorbe les radiations UV et limitent l'excitation de la partie intérieure (mésophylle) de la feuille, origine de la fluorescence chlorophyllienne (Gitelson *et al.*, 1998; Meyer *et al.*, 2003).



**Figure 4.22** Spectres moyens des trois groupes des plantes cultivées sous conditions contrôlées et sous conditions naturelles au champ

La méthode de classification SIMCA a été appliquée sur les deux jeux de données. Pour chaque jeu de données, des sous-modèles ont été construits pour chaque modèle SIMCA. Le nombre des composantes principales pour chaque sous-modèle correspond à la combinaison la plus performante (i.e. erreur de prédiction la plus faible). Pour les classes maïs, mauvaises herbes monocotylédones et mauvaises herbes dicotylédones, les modèles SIMCA les plus performants ont respectivement 1, 1 et 2 composantes principales pour nos données et, 2, 3 et 4 composantes principales pour les données de Longchamps *et al.* (2006).

L'erreur de prédiction chez les plantes cultivées sous conditions contrôlées est de 10 % (Tableau 4.8). La source d'erreur la plus importante vient de la confusion entre le maïs et les mauvaises herbes monocotylédones (50 % de l'erreur). La deuxième source d'erreur est due à la confusion entre les mauvaises herbes monocotylédones et dicotylédones (39.58 %). La troisième source d'erreur est la confusion entre les mauvaises herbes monocotylédones et le maïs (7,63 %). Enfin, la confusion entre le maïs et les mauvaises dicotylédones est la plus faible source d'erreur (2,77 %). Pour les plantes d'extérieur, l'erreur de prédiction est de 7 % (Tableau 4.9). La seule source d'erreur provient de la confusion de maïs avec les mauvaises herbes monocotylédones (100 %). On a remarqué plus haut que, pour les plantes ayant poussé à l'extérieur, la FChl est relativement moins importante. Or dans le spectre de fluorescence, c'est la FChl qui varie le plus en fonction des conditions environnementales au moment de la mesure. Aussi, la FChl est un facteur discriminant important pour séparer les dicotylédones des monocotylédones et du maïs. Lors des mesures dans les travaux de Longchamps (2006), les conditions environnementales (intensité lumineuse et température) dans la serre lors des mesures étaient variables. Cette variabilité environnementale a inévitablement induit une variabilité additionnelle dans les spectres de fluorescence, ce qui explique que, d'une part, les performances globales sont moins bonnes pour les données de Longchamps et que, d'autre part, il y a de la confusion impliquant les dicotylédones chez Longchamps alors qu'il n'existe aucune confusion de la sorte dans notre cas.

**Tableau 4.8**

Matrice de confusion obtenue par le modèle SIMCA avec les plantes cultivées en conditions contrôlées. Pourcentage par classe entre parenthèse

Réelles	Prédites		
	Maïs	Mono	Dico
<b>Maïs</b>	403 (84 %)	<b>72</b> <b>(15 %)</b>	<b>4</b> <b>(1 %)</b>
<b>Mono</b>	<b>11</b> <b>(2 %)</b>	402 (86 %)	<b>57</b> <b>(12 %)</b>
<b>Dico</b>	0	0	461 (100 %)



**Tableau 4.9**

Matrice de confusion obtenue par le modèle SIMCA avec les plantes cultivées à l'extérieur

	Réelles	Prédites		
	Maïs	Mono	Dico	
Maïs	35 (81,4 %)	8 (18.6 %)	0	
Mono	0	44 (100 %)	0	
Dico	0	0	35 (100 %)	

#### 4.2.5 Conclusion

Lors de cette deuxième partie de travail, nous avons étudié le potentiel discriminant de la fluorescence à distinguer entre les trois groupes des plantes (maïs, mauvaises herbes monocotylédones et mauvaises herbes dicotylédones) sous différentes intensités lumineuses ambiantes. Les résultats obtenus montrent qu'il est possible de discriminer entre les maïs et les mauvaises herbes (mono et dico) avec un pourcentage de réussite important variant entre 95 et 99 % en validation croisée. Malgré les variations causées sur la signature spectrale de fluorescence, l'intensité lumineuse ambiante affecte peu le potentiel discriminant de la fluorescence induite par UV. Comparés à ceux de Longchamps *et al.* (2006), les spectres de nos plantes ont une FBV plus élevée et une FChl relativement moins importante. L'erreur de prédiction chez les plantes cultivées sous conditions contrôlées est plus haute que, chez les plantes cultivées à l'extérieur. La source d'erreur la plus importante est la même chez les deux types de plantes. Elle s'agit de la confusion entre le maïs et les mauvaises herbes monocotylédones. La différence dans l'erreur de prédiction est due aux conditions de mesure des spectres de fluorescence. En fait, la FChl est un facteur discriminant important pour séparer les dicotylédones des monocotylédones et du maïs. Lors des mesures dans les travaux de Longchamps (2006), les conditions environnementales (intensité lumineuse et température) dans la serre lors des mesures étaient variables.



Cette variabilité environnementale a inévitablement induit une variabilité additionnelle dans les spectres de fluorescence, ce qui explique que, d'une part, les performances globales sont moins bonnes pour les données de Longchamps (2006) et que, d'autre part, il y a de la confusion impliquant les dicotylédones chez Longchamps alors qu'il n'existe aucune confusion de la sorte dans notre cas.

Enfin, il importe de mentionner que les mesures dans les travaux de Longchamps (2006) ont été effectuées sur des plantes de différents âges et sur différentes positions de la feuille. Ces facteurs (âge et position sur la feuille) sont reconnus comme affectant l'émission de fluorescence induite par UV (Cerovic et al., 1999). Longchamps (2006) a montré que ces deux facteurs influençaient faiblement le potentiel de fluorescence à discriminer entre le maïs et les mauvaises herbes. Cette influence peut donc expliquer en partie la plus grande erreur de prédiction chez les plantes cultivées sous conditions contrôlées par rapport à l'erreur calculée à partir de celles cultivées à l'extérieur.

## CHAPITRE V

### CONCLUSION GÉNÉRALE

L'eau douce est une ressource indispensable à la vie. Elle représente seulement 1 % de l'eau présente sur terre et elle est mal distribuée sur notre planète. Ceci la rend une source de plus en plus précieuse. Le Québec possède une importante réserve d'eau douce estimée à 3 % des réserves mondiales (MDDEQ, 2002). Depuis 2002, le Québec a mis en place une politique qui vise à protéger ses ressources en eau douce. Cependant, de travail reste à faire pour atteindre les objectifs, notamment en milieu agricole. Dans ce dernier, les cours d'eau sont plus au moins pollués par l'utilisation des engrais et des pesticides. La classe des pesticides la plus importante est de loin celle des herbicides, qui représentent environ 77 % des pesticides vendus.

Une des stratégies prometteuses menant à la réduction des herbicides repose sur l'observation selon laquelle les mauvaises herbes ne sont pas distribuées uniformément au champ, mais se retrouvent souvent de façon agglomérée (Perry *et al.*, 2002; Thornthorn *et al.*, 1990, Miller *et al.* (2003)). Par conséquent, une réduction de l'utilisation des herbicides est possible par leur application seulement aux endroits infestés par les mauvaises herbes plutôt qu'une application uniforme dans les champs.

En moyenne, le traitement localisé d'herbicides permet d'économiser 54 % par rapport à la quantité à utiliser pour le traitement généralisé sur tout le champ (Timmermann *et al.*, 2003). Les opérations pour localiser et traiter des îlots de mauvaises herbes dans les champs peuvent s'effectuer par diverses techniques faisant partie de l'agriculture de précision. Une approche pour l'identification automatique des mauvaises herbes est la fluorescence, dont les spectres d'émission peuvent être considérés comme une signature spécifique permettant d'identifier les espèces végétales. Une étude menée lors d'un projet de maîtrise à l'Université Laval a démontré le potentiel de l'analyse spectrale de la fluorescence des végétaux à discriminer efficacement entre quatre hybrides de maïs et 8 espèces de mauvaises herbes

représentatives du sud du Québec (Longchamps, 2006). Les mesures de fluorescence ont été réalisées dans cette étude sous des conditions contrôlées en serre avec des plantes cultivées dans des chambres de croissance. Or, la signature spectrale de la fluorescence des feuilles d'une espèce végétale est déterminée par leurs caractéristiques intrinsèques, qui elles, dépendent en partie des conditions environnementales à moyen terme lors de la croissance ainsi que des conditions ambiantes à court terme, lors des mesures de fluorescence (Buschmann *et al.*, 2000; Lichtenthaler *et al.*, 1997; Cerovic *et al.*, 1999). Par conséquent, il est important de vérifier si les résultats de l'étude de Longchamps peuvent être reproduits avec des plantes à l'extérieur et exposées à différentes intensités lumineuses ambiantes, conditions se rapprochant davantage de celles rencontrées au champ. Sur la base de ces informations, des hypothèses ont été émises : l'intensité lumineuse affecte la signature spectrale de la fluorescence et il est possible de discriminer entre le maïs et les mauvaises herbes sous conditions naturelles au champ en se basant sur leur signature spectrale de fluorescence induite par UV.

Premièrement, nos résultats ont montré que l'intensité lumineuse affecte la signature spectrale de fluorescence en diminuant le ratio FBV/FChl. Par contre, le ratio FR/FRL est insensible aux variations de l'intensité lumineuse. Nous avons remarqué aussi que l'effet de la lumière sur la signature spectrale de fluorescence varie avec l'espèce.

Dans la deuxième partie des recherches, nous avons déterminé l'efficacité de la signature spectrale de fluorescence à discriminer les groupes de plantes (maïs et mauvaises herbes monocotylédones et dicotylédones) cultivées à l'extérieur et soumises à différentes intensités de lumière ambiante (de 0 à 900  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Le potentiel discriminant de la fluorescence a été évalué par la méthode de classification SIMCA. Nous avons montré qu'il est possible de discriminer entre le maïs et les mauvaises herbes cultivées sous conditions similaires au champ avec un pourcentage de réussite de 99 % à l'obscurité. Malgré les variations causées sur la signature spectrale de fluorescence, l'intensité lumineuse ambiante n'affecte pas le potentiel discriminant de la fluorescence induite par UV. Ainsi, le taux de succès varie entre 99 % à l'obscurité à de 95 % en validation croisée sous 900  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Ceci nous a permis d'étalonner des

modèles performants et robustes permettant d'obtenir un bon pourcentage de bien classés (entre 86 et 97 %) à toutes les intensités. Aussi, la source d'erreur de prédiction était pour la plupart du temps la confusion entre les monocotylédones (maïs et mauvaises herbes monocotylédones).

Nos résultats ont montré que l'intensité lumineuse affecte la signature spectrale de fluorescence en diminuant le ratio FBV/FChl. L'effet de la lumière sur la signature spectrale de fluorescence varie avec l'espèce. En se basant sur ces observations on s'attendait que l'intensité lumineuse affectera le potentiel discriminant de la fluorescence induite sous UV à distinguer entre les plantes. Or, ça n'était pas le cas. Ainsi, nous avons obtenu un taux de succès qui varie entre 99 % à l'obscurité à 95 % sous  $900 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  en validation croisée. De plus, nous avons conclu qu'il est possible d'étalonner des modèles SIMCA performants permettant une classification robuste peu importe l'intensité lumineuse. Où, le taux de succès de bien classé si on applique un modèle étalonné à une intensité lumineuse quelconque varie entre 86 % et 97 % en prédiction. L'analyse en composante principale se base sur les deux types de fluorescence (FBV et FChl) pour discriminer entre les groupes de plantes. Or, la FBV est insensible aux variations de l'intensité lumineuse. Aussi, les résultats montrent que le ratio de la FChl est insensible (FR/FRL) aux variations de l'intensité lumineuse. De même, on a remarqué que la variation de ratio FBV/FR avec l'intensité lumineuse est similaire ( $34 \pm 1\%$ ) chez les trois groupes de plantes (maïs, mauvaises herbes monocotylédones et mauvaises herbes dicotylédones). D'où le potentiel discriminant de la fluorescence à distinguer entre les groupes de plantes ne sera pas affecter malgré les variations d'intensité lumineuse. Si on compare le ratio FBV/FR avec les vecteurs propres pour chaque groupe de plantes à chaque intensité lumineuse nous remarquons que FBV/FR diminue avec l'augmentation lumineuse. Alors que, pour chaque groupe de plantes, les vecteurs propres semblent contenir de plus en plus de bruit à mesure que l'intensité lumineuse augmente. Donc, une diminution de FBV/FR est associée à une augmentation de bruit chez les vecteurs propres. De plus, on a remarqué quand l'intensité lumineuse est plus grande, le bruit résiduel de la lampe est en moyenne, plus grand. L'analyse en composante principale réussit alors mieux à isoler ce bruit du signal de fluorescence

dans des composantes qui ne sont pas retenues pour les modèles. Donc, l'intensité lumineuse affecte la signature spectrale de fluorescence en diminuant la FBV/FR. Aussi, elle fait augmenter le bruit au niveau de vecteurs propres de chaque groupe ce qui permet d'isoler ce bruit par l'ACP et d'où avoir une bonne discrimination. On conclut que malgré les variations causées par la variation de l'intensité lumineuse sur la signature spectrale de fluorescence, le potentiel discriminant ne sera pas trop affecté.

Dans une autre étape, nos données ont été comparées à celles de Longchamps *et al.* (2006) dont les plantes ont été cultivées sous conditions contrôlées en cabinet de croissance. Nos données ont été obtenues à partir de plantes qui ont poussé à l'extérieur. Il était donc intéressant de comparer les résultats obtenus avec ces 2 jeux de données pour voir si les conditions de croissance ont un impact sur le potentiel discriminant. Comparés à ceux de Longchamps *et al.* (2006), les spectres de nos plantes ont une FBV plus élevée et une FChl relativement moins importante. L'erreur de prédiction chez les plantes cultivées sous conditions contrôlées est plus élevée (10 %) que chez les plantes cultivées à l'extérieur (7 %). La source d'erreur la plus importante est la même chez les deux types de plantes. Il s'agit de la confusion entre le maïs et les mauvaises herbes monocotylédones. La différence dans l'erreur de prédiction est due aux conditions de mesure des spectres de fluorescence. Lors des mesures dans les travaux de Longchamps (2006), les conditions environnementales (intensité lumineuse et température) dans la serre étaient variables. Cette variabilité environnementale a inévitablement induit une variabilité additionnelle dans les spectres de fluorescence. De plus, la variabilité induite par les facteurs âge et position sur la feuille dans les travaux de Longchamps (2006) contribue à la plus grande erreur de prédiction chez les plantes cultivées sous conditions contrôlées par rapport à l'erreur calculée à partir de celles cultivées à l'extérieur.

Enfin, on conclut qu'il est possible à discriminer entre le maïs et les mauvaises herbes cultivées à l'extérieur sous conditions similaires à celles aux champs. Les résultats sont plus probants que ceux trouvés avec des plantes cultivées en cabinet de croissance (Longchamps *et al.*, 2006). Aussi, on conclut que la stratégie de classification la plus performante est celle classant directement les plantes en groupes, maïs, mauvaises herbes monocotylédones, mauvaises herbes dicotylédones.

Ces résultats permettent d'établir la base de la discrimination des plantes à l'aide de la signature spectrale de fluorescence induite par UV. Les prochaines étapes seront de vérifier si l'utilisation d'autres longueurs d'onde pourra maximiser la discrimination. Aussi, l'effet d'autres facteurs environnementaux (T, pluviométrie) sur le potentiel discriminant des signatures spectrales reste à être évalué. Aussi, il reste à tester un capteur adéquat qui peut être utilisé sur le terrain au champ. De même, de trouver une source d'excitation qui ne provoque pas de bruit résiduel. Le développement rapide des technologies informatiques, optiques et mécaniques accélérera peut-être le transfert au champ de cette technologie qui pourrait mener à réduire la quantité d'herbicides utilisés aux champs et qui atteignent par la suite les cours d'eau. Aussi, il faudrait tester cette avenue avec d'autres cultures. Plusieurs questions restent à élucider avant de pouvoir utiliser cette pratique à grande échelle, mais ici la démonstration a été faite que la signature spectrale de fluorescence induite par UV des végétaux contient de l'information qui permet de discriminer entre les végétaux.

## BIBLIOGRAPHIE

- Agati G., Mazzinghi P., Fusi F., Ambrosini I. (1995). The F685/F730 chlorophyll fluorescence ratio as toll in Plant Physiology: Response to Physiological and Environmental Factors. *J. Plant Physiol.*, 145:228-238.
- Agati G., Mazzinghi P., Paola L.D., Fusi F., Cecchi G. (1996). The F685/F730 chlorophyll fluorescence ratio as indicator of chilling stress in plants. *J. plant physiol.* 148:384-390.
- Anonyme. (2004) Crop life canada. Progress report 2003-2004.  
<http://www.croplife.ca/français/aboutcpi/industrystatistics.html>
- Bongi G., Goulas Y., Moya I., Schmuck G. (1991). Détection simultanée dans les bandes bleu et rouge de la fluorescence induite par laser des végétaux, in : physical measurements and signatures in remote Sensing, ESA SP-319, Courchevel, France. 719-722.
- Bongi G., Palliotti A., Rocchi P., Moya I., Goulas Y. (1994). Blue-green fluorescence exited by UV laser on leaves of different species originates from cuting and is sensitive to leaf temperature. *Plant Cell Environ.* 17:777-780.
- Boutin, D. (2000). Évaluation des bénéfices économiques liés à l'atteinte des objectifs du plan d'action 1998-2005 en agroenvironnement. Présenté au MAPAQ et au MENV dans le cadre du BAPE. 62.
- Briantais J.M., Vernotte C., Krausse G.H., Weis E. (1986). Chlorophyll a fluorescence of higher plants: chloroplasts and leaves. In *Light Emission by Plants and Bacteria*. Academic Press.539-583.
- Broglia, M. (1993). Blue-green laser-induced fluorescence from intact leaves-Actinic light sensitivity and subcellular origins. *Appl.opt.* 32:334-338.
- Brugnoli E., Bjorkman O. (1992). Chloroplast movements in leaves: influence on chlorophyll fluorescence and measurements of light induced absorbance changes related to  $\Delta pH$  and zeaxanthin formation. *Photosynth. Res.*, 32:23-55.
- Burchard P., Bilger W., Weissenbock G. (2000). Contribution of hydroxycinnamates and flavonoids to epidermal shielding of UV-A and UV-B radiation in developing rye primary leaves as assessed by ultraviolet-induced chlorophyll fluorescence measurements. *Plant, cell and environment.* 23:1373-1380.
- Buschmann C., Langsdorf G., Lichtenthaler H.K. (2000). Imaging of blue, green and red fluorescence emission of plants: On overview. *Photosynthetica.* 38(4):483-491.



- Buschmann C., Lichtenthaler H.K. (1998). Principles and characteristics of multicolour fluorescence imaging of plants. *Journal Of Plant Physiology*. 152(23):297-314.
- Canaani, O. (1990). Photoacoustic studies on the dependence of state transitions on grana stacking. *Photosynth.*, 25:225-232.
- Carter, A.D. (2000). Herbicide movement in soil: Principles, pathways and process. *Weed Research*. 40 :113-122.
- Cerovic Z.G., Samson G., Morales F., Tremblay N., Moya I. (1999). Ultraviolet-induced fluorescence for plant monitoring: present state and prospects. *Agronomie*. 19: 543-578.
- Chancellor, W.J., Goronea, M.A. (1993). Spatial variability of nitrogen, moisture and weeds. ASAE Paper No.93-1069. St-Joseph, Mich: ASAE.
- Chappelle, E.W., Wood, F.M., McMurtrey, J.E.I., Newcomb, W.W. (1984). Laser induced fluorescence of green plants. 1: A technique for the remote detection of plant stress and species differentiation. *Applied Optics*. 23(1):134-138.
- Chappelle, E.W., Wood F.M., McMurtray J.E.I., Newcomb W.W. (1985). Laser induced fluorescence of green plants. 3: LIF spectral signatures of five major plant types. *Appl Opt*. 24:74-80.
- Cleland R.E., Melis A., Neale P.J. (1986). Mechanism of photoinhibition: photochemical reaction center inactivation in system II of chloroplasts. *Photosynth. Res*. 9:79-88.
- Corp L.A., McMurtrey J.E., Chappelle E.W., Daughtry C.S.T., Kim M.S. (1997). UV band fluorescence (in vivo) and its implication to the remote assessment of nitrogen supply in vegetation, *Remote Sens. Environ*. 61:110-117.
- Corp A.L., McMurtrey J.E., Middleton E.M., Mulchi C.L., Chappelle E.W., Daughtry. (2003). Fluorescence sensing system: In vivo detection of biophysical variations in field corn due to nitrogen supply. *Remote Sensing of Environment*. 86:470-479.
- Cui, M., Vogelmann, T. C., & Smith, W. K. (1991). Chlorophyll and light gradients in sun and shade leaves of *Spinacia oleracea*. *Plant and Cell Environment*. 14, 493- 500.
- Dahn H.G., Gunther K.P., Ludeker W. (1992). Characterization of drought stress of maize and wheat canopies by means of spectral resolved laser induced fluorescence, *EARSel ADV. Remote Sens*. 1:12-19.



- Eriksson, L., Johansson, E., Muller, M. and Wold, S. (2000). "On the selection of the training set in environmental QSAR analysis when compounds are clustered." *J. Chemometrics* 14: 599-616.
- Genty B., Briantais J., Barker N. (1990). Non-photochemical quenching of F0 in leaves is emission wavelength dependent: consequences for quenching analysis and its interpretation, *Photosynth. Res.* 26:133-139.
- Gitelson A.A., Buschmann, C., Lichtenthaler H.K. (1998). Leaf chlorophyll fluorescence corrected for reabsorption by means of absorption and reflectance measurement. *J.Plant Physiol.* 152: 283-296.
- Govindjee. (1995). Sixty-three Years Since Kautsky: Chlorophyll a Fluorescence. *Aust.J.Plant Physiol.* 22: 131-60.
- Haris P.J., Hartley R.D. (1980). Detection of bound ferulic acid in the cell walls of the Gramineae by ultra-violet fluorescence microscopy. *Nature.* 259:508-510.
- Havaux M., Gruszecki W.I. (1993). Heat and light-induced chlorophyll a fluorescence changes in potato leaves containing high or low levels of the carotenoid zeaxanthin: indication of a regulatory effect of zeaxanthin on thylakoid membrane fluidity. *Photochem. Photobiol.* 58:607-614.
- Heisel F., Sowinska M., Mieché J.A., Lang M., Lichtenthaler H.K. (1996). Detection of nutrient deficiencies of maize by laser induced fluorescence imaging. 148:622-631.
- Horton P., Ruban, A.V., Walter R.G. (1996). Regulation of light harvesting in green plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Bio.* 47:665-684.
- Johnson, G.A., Mantha, S.V., Day, T.A. (2000). Aspectrofluorometric Survey of UV-induced blue-green fluorescence in foliage of 35 species. *J. plant physiol.* Vol.156. pp. 242-252.
- Johnson, G.A, Scholes, J.D., Grime, J.P. et Horton, P. (1990). "Fluorescence responses on step changes in irradiance by plants from different light habitats." *Proceedings of the VIIIth international congress on photosynthesis.*
- Johnson G.A, Young A.J., Horton P. (1993). The dissipation of excess excitation energy in British plant species. *Plant, cell and environment.* 16:673-679.
- Kohavi, R. and Provost, F. (1998). "Glossary." *Machine learning journal* 30: 271-274.
- Krause G.H., Weis E. (1991). Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basic. *Annual review of plant physiology and molecular biology.* 42:313-349.

- Lambers H., Chapin III.F.S, Pons T.L. (1998). Plant physiological ecology. Livre: 568p.
- Lazar, D. (1999). Chlorophyll a fluorescence induction. *Biochimica et biophysica Acta*. 1412 :1-28.
- Le Bourgeois, T., Marnotte, P. (2001). CIRAD (Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement), Ciard, siège social 42, rue scheffer, 75116 paris, france.  
[http://malherbologie.ciard.fr/Fr/generalites/index\\_generalites.php?pagied=cout](http://malherbologie.ciard.fr/Fr/generalites/index_generalites.php?pagied=cout)
- Lichtenthaler, H.K., Burkart, S., Schindler, C. and Stober, F. (1992). "Changes in photosynthetic pigments and in vivo chlorophyll fluorescence parameters under photoinhibitory growth conditions." *Photosynthetica* 27: 343-353.
- Lichtenthaler H.K., Lang M., Sowinska M., Summ. P., Heisel F., Miehé A. (1997). Uptake of the herbicide diuron (DCMU) as visualized by the fluorescence imaging technique. *Botanica Acta*. 110:158-163.
- Lichtenthaler H.K., Miehé J.A. (1997). Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress, *Trends in plant Sciences (TIPS)*. 2:316-320.
- Lichtenthaler H.K., Rinderle U. (1988). The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants. *CRC critical rev. Anal chem*. 19:29-85.
- Lichtenthaler, H.K., Schweiger J. (1998). Cell wall bound ferulic acid, the major substance of the blue-green fluorescence emission of plants. *J. plant physiol*. 152:272-282.
- Longchamps L., Panneton B., Leroux G.D., Thériault R. (2006). Variation of induced fluorescence spectral signature of corn and eight weed species due to plant age and localisation on the leaf. Non publié.
- Maxwell K., Johnson G.N. (2000). Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *Journal of experimental botany*. 51(345):659-668.
- McMurtray J.E.I., Chappelle E.W., Kim M.S., Meiseigner J.J., Corp L.A. (1994). Distinguishing nitrogen fertilisation levels in field corn (*Zea mays* L) with actively induced fluorescence and passive reflectance measurement, *remote sens. environ*. 47:36-44.
- MDDEQ (2002), "L'eau. La vie. L'avenir. Politique nationale de l'eau" Bibliothèque nationale du Québec, 2002.
- Medlin C.R., Shaw D.R. (2000). Economic comparaison of broadcast and site-specific herbicide applications in nontransgenic and glyphosate-tolerant glycine max. *Weed Science*. 48(50):653-661.

- Mercure, S.-M., Daoust, B. et Samson, G. (2004). "Causal relationship between growth inhibition, accumulation of phenolic metabolites, and changes of UV-induced fluorescences in nitrogen-deficient barley plants." *can. J. bot./Rev. Can. Bot.* 82(6): 815-821.
- Meyer G.E., Mehta, T., Kocher, M.F., D.A., Samal, A. (1998). Textural imaging and discriminant analysis for distinguishing weeds for spot spraying. *Transactions of the ASAE.* 41(4):1189-1198.
- Meyer G.E., Cartelat A., Moya I., Cerovic Z.G. (2003). UV-induced blue-green and far-red fluorescence along wheat leaves: a potential signature of leaf ageing. *Journal of experimental botany.* 54(383): 757-769.
- Miller P.C.H. (2003) Patch spraying: future role of electronics in limiting pesticide use. *Pest Manag. Sci.* 59: 566-574.
- Morales F., Cerovic Z.G., Moya I. (1994). Characterization of blue-green fluorescence in the mesophyll of sugar beet (*Beta vulgaris* L) leaves affected by iron deficiency, *plant physiol.* 106:127-133.
- Morales, F., Cerovic, Z.G. et Moya, I. (1996). "Time-resolved blue-green fluorescence of sugar beet ( *Beta vulgaris* L.) leaves. Spectroscopic evidence for the presence of ferulic acid as the main fluorophore of the epidermis." *biochimica et biophysica acta* 1273: 251-262.
- Morales F., Cerovic Z.G., Moya I. (1998). Time-resolved blue-green fluorescence of sugar beet leaves. Temperature-induced changes and consequences for the potential use of blue-green fluorescence as a signature for remote sensing of plants. *Aust.J. Plant Physiol.* 25:325-334.
- Moshou, D., De Ketelaere, B., Vrindts, E., Kennes, P., Debaerdmaecker, J., Ramon, H. (1999). Local linear mapping neural networks for pattern recognition of plants. *Control applications and Ergonomics in Agriculture (CAEA 98).* Proceedings volume from the IFAC workshop., kidlington, UK. Elsevier science.
- Müller P., Niyogi K.K., Li X.P. (2001). Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant physiology.* 125:1558-1566.
- Noble, S.D., Brown, R.B., Crowe, T.G. (2002). The use of spectral properties for weed detection and identification-a review. *AIC 2002 meeting CSAE/SCGR* 02-208:1-17.
- Norikane, J.H., Kuruta. (2001). Water stress detection by monitoring fluorescence of plants under ambient light. *Transactions of the ASAE.* 46(6):1915-1922.

- Ounis A., Cerovic Z.G., Briantais J.M., Moya I. (2001). Dual-excitation FLIDAR for the estimation of epidermal UV absorption in leaves and canopies. *Remote sensing of environment*. 76:33-48.
- Panneton B., Roger J.M., Guillaume S., Longchamps L. (2007). Effect of processing of UV-induced fluorescence spectra in plant fingerprinting applications.
- Perry, N., Hull, R.I., Lutman, P.J.W. (2002). Stability of weed patches. *Proceedings 2002, 12th european weed research symposium, wageningen, the netherlands*. 398-399.
- Pfundel E. (1998). Estimating the contribution of photosystem I to total leaf chlorophyll fluorescence. *Photosynth*. 56:185-195.
- Raven, Evert et Eichhorn. (2000). *Biologie végétale*. 6ème édition De Boeck Université s.a.
- Schreiber U., Vidaver W. (1976). The I-D fluorescence transient an indicator of rapid energy distribution changes in photosynthesis. *Biochimica et biophysica acta*. 440(1): 205-214.
- Stober, F, Lang, M. and Lichtenthaler, H.K. (1994). "Blue, green, and red fluorescence emission signatures of green, etiolated, and white leaves." *remote sensing of environment* 47: 65-71.
- Stober F., Lichtenthaler H.K. (1993). Studies on the constancy of blue and green fluorescence yield during the chlorophyll fluorescence induction kinetics (Kautsky effect), *radiat environ. Biophys*. 32:357-365.
- Thornton, P.K., Fawcett, R.H., Dent, J.B., Perkins, T.J. (1990). Spatial weed distribution and economic thresholds for weed control. *Crop Protection*. 9(5):249-260.
- Timmermann C., Gerhards R., Kuhbauch W. (2003). The economic impact of site specific weed control. *Precision Agriculture*. 4(3):249-260.
- Tyystjarvi E., Koski A., Keranen M., Nevalainen O. (1999). The Kautsky curve is a built-in barcode. *Biophysical Journal*. 77:1159-1167.
- Ulrich Schreiber (2000). Pulse-amplitude-modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method (texte non publié).
- Wise, B.M., Gallagher, N.B., Bro, R., Shaver, J.M., Windig, W. and Koch R.S. (2004). "PLS\_Toolbox Version 3.5 for use with MATLAB™." Eigenvector research, inc., 830 wapato Lake Road, Manson, WA 98831 USA.

- Woebbecke, D.M., Meyer, G.E., Von Bargaen, K., Mortensen, D.A. (1995). Shape feature for identifying young weeds using image analysis. Transactions of the ASAE, 38(1):271-181.
- Wollenweber E., Dietz V.H. (1981). Occurrence and distribution of free flavonoid aglycones in plants. Phytochemistry. 20:869-932.
- Yonekawa, S., Sakai, N., Kitani, O. (1996). Identification of idealized leaf Types using simple dimension less shape factors by image analysis. Transactions of the ASAE. 39(4):1525-1533.